ORSAY
N° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

# THESE

PRESENTEE

POUR OBTENIR

*LE GRADE DE DOCTEUR ès SCIENCES NATURELLES*

PAR

Yves LECARPENTIER

Sujet de la thèse

## MECANIQUE CARDIAQUE : ETUDE DE L'HYPERTROPHIE MYOCARDIQUE ET DES SARCOMERES PAR DIFFRACTION LASER

*Soutenue le 17 Juin 1983, devant la commission d'examen*

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Messieurs* | *E.* | *CORABOEUF* | *Président* |
| | *G.* | *VASSORT* | *Rapporteur* |
| | *D.* | *BRUTSAERT* | |
| | *M.* | *DUVELLEROY* | |
| | *P.Y.* | *HATT* | |
| *Madame* | *K.* | *SCHWARTZ* | |

UNIV.
LIBRARY
NEBR.

ORSAY
N° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

# THESE

PRESENTEE

POUR OBTENIR

*LE GRADE DE DOCTEUR ès SCIENCES NATURELLES*

PAR

**Yves LECARPENTIER**

Sujet de la thèse

## MECANIQUE CARDIAQUE : ETUDE DE L'HYPERTROPHIE MYOCARDIQUE ET DES SARCOMERES PAR DIFFRACTION LASER

*Soutenue le 17 Juin 1983, devant la commission d'examen*

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Messieurs* | *E.* | *CORABOEUF* | *Président* |
| | *G.* | *VASSORT* | *Rapporteur* |
| | *D.* | *BRUTSAERT* | |
| | *M.* | *DUVELLEROY* | |
| | *P.Y.* | *HATT* | |
| *Madame* | *K.* | *SCHWARTZ* | |

A ma femme, mon fils Edouard

et mes Parents

Ce travail a été réalisé au

Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique-ENSTA

et à l'I.N.S.E.R.M. U2.

Mes remerciements vont

à Monsieur le Professeur E. CORABOEUF

qui m'a fait l'honneur de présider cette Thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

à Mon Maître le Professeur P. Y. HATT

qui a encouragé et favorisé ce travail depuis la première heure. Qu'il reçoive ici le témoignage de toute ma reccnnaissance et de toute mon admiration pour son oeuvre.

à Monsieur le Professeur A. ORSZAG

qui nous a ouvert les portes de son laboratoire. Je le remercie de sa compréhension et de sa générosité pour avoir tant contribué à développer nos études de biologie.

à Mon Maître le Professeur D. L. BRUTSAERT

dont les idées originales marquent la physiologie cardiaque depuis une décennie. L'année passée à ses côtés à Anvers fut féconde.

à Madame K. SCHWARTZ

pour son travail de synthèse dans les domaines de la biochimie et de la physiologie cardiaques.
Je la remercie de sa collaboration et de sa confiance.

à Monsieur le Professeur M. DUVELLEROY

pour avoir contribué à transcrire la physiologie cardiaque en langage biophysique qui élargit les possibilités de réflexion.

à Monsieur G. VASSORT

pour sa rigueur scientifique et son enthousiasme qui sont pour nous des exemples.

à Mon Ami Jean-Louis MARTIN

à qui je souhaite la plus belle aventure scientifique qui soit.

à Monsieur A. ANTONETTI

pour avoir aidé et aimé la Biologie et pour son amitié. Nous lui devons beaucoup.

à Madame DRONNE

pour sa conscience professionnelle et son efficacité.

à Tous ceux qui dans le Laboratoire d'Optique Appliquée m'ont apporté leur amical soutien et aide de tous les instants :

- A. MIGUS
- J. P. CHAMBARET
- A. dos SANTOS
- G. GRILLON
- J. ETCHEPARE
- Madame RODRIGUEZ
- Madame BABILOTTE
- Y. B. ANDRE
- C. BRUNEAU
- J. M. LEMAITRE
- R. ASTIER
- G. HAMONIAUX
- E. CHEMLA

- G. PORTEBOEUF
- D. CHEMLA
- M. CLERGUE
- G. BOURDET
- P. GASTINEAU

à J. HOERTER, A. M. LOMPRE et J. J. MERCADIER

pour leur collaboration précieuse.

à B. SWYNGHEDAUW

pour m'avoir amicalement aidé en maintes circonstances ; je l'en remercie sincèrement de même que pour sa collaboration scientifique.

à V. CLAES

pour avoir conçu un appareillage électronique hautement performant et pour son amitié.

à L. BUGAISKY

pour sa confiance et sa collaboration.

au Professeur C. APSTEIN

pour son amitié, sa collaboration, et qui m'a rappelé qu'un Chercheur pouvait rester Médecin.

# P L A N

INTRODUCTION ..... p. 1

CHAPITRE I : MESURE DES SARCOMERES EN TEMPS REEL PAR DIFFRACTION LASER..... p. 8

I - A. : HISTORIQUE. Revue bibliographique de la mesure des sarcomères par diffraction... p. 8

1) Au repos

a - Le muscle squelettique

α ) Le muscle squelettique entier..... p. 10

β ) La fibre squelettique isolée..... p. 11

b - Le muscle cardiaque

α ) Le muscle cardiaque isolé..... p. 11

β ) Les myocytes isolés..... p. 12

2) Lors d'une contraction isotonique ou isométrique

a - Le muscle squelettique

α ) Le muscle squelettique entier..... p. 12

β ) La fibre squelettique isolée..... p. 12

b - Le muscle cardiaque

α ) Le muscle cardiaque isolé..... p. 13

β ) Les myocytes isolés..... p. 14

3) Lors d'un tétanus isométrique

a - Le muscle squelettique

α) Le muscle squelettique entier..... p. 15

β) La fibre squelettique isolée..... p. 15

b - Le muscle cardiaque..... p. 16

I - B. : TECHNIQUE DE LA MESURE DYNAMIQUE DES SARCOMERES PAR DIFFRACTION LASER..... p. 17

1) Rappel histologique de la constitution des sarcomères..... p. 18

2) Rappel physique sur le phénomène de diffraction..... p. 19

3) Apport d'une source laser dans la facilitation de l'analyse des images de diffraction..... p. 20

4) Le muscle strié assimilable à un réseau.. p. 21

5) Préparations et matériels biologiques.... p. 23

6) Le diffractomètre

a - Montage optique..... p. 25

b - Influence de la longueur de la frange sur la lumière transmise par le coin densitométrique W..... p. 31

7) La Chaîne d'amplification électronique des signaux optiques..... p. 33

8) Précision de la mesure..... p. 34

9) Mesures de la force et du raccourcissement des muscles..... p. 35

I - C. : RESULTATS..... p. 35

1) Sur le muscle squelettique

a - La phase de contraction des sarcomères..... p. 36

b - Relation bijective SV-SL..... p. 38

c - Mesure de la vitesse maximale de raccourcissement..... p. 41

d - Effets de la variation d'inotropie sur la cinétique de raccourcissement des sarcomères..... p. 41

2) Sur le muscle cardiaque

a - Caractéristiques mécaniques des trabécules au repos..... p. 45

b - Caractéristiques mécaniques des trabécules lors de la contraction "isométrique" à $L_{max}$..... p. 46

c - Raccourcissement des sarcomères..... p. 46

d - Raccourcissement des sarcomères en fonction du temps, à divers niveaux de charge totale..... p. 46

e - La relation pic de vitesse des sarcomères - force du muscle (SV-MF)... p. 48

f - Vitesse maximale du sarcomère à charge nulle par la méthode du "zero-load-clamp"..... p. 49

g - Effet inotrope..... p. 50

I - D. : LA RELATION BIUNIVOQUE VITESSE-RACCOURCISSEMENT..... p. 52

1) Equation de la force engendrée par les éléments contractiles..... p. 52

2) Equations des forces dues aux aux éléments visco-élastiques..... p. 54

3) Equation générale du système..... p. 55

4) Résultats..... p. 55

CHAPITRE II : LA RELAXATION..... p. 63

A. : INTRODUCTION..... p. 63

B. : RAPPORTS ENTRE RETICULUM SARCOPLASMIQUE FONCTIONNEL ET SENSIBILITE DE LA RELAXATION A LA CHARGE..... p. 66

1) Destruction ou inhibition du réticulum sarcoplasmique dans le coeur de mammifère..... p. 66

2) La relaxation du myocarde de grenouille..... p. 67

d - Modifications précoces et simultanées des isoenzymes de la myosine et de la vitesse maximale de raccourcissement au cours de l'hypertrophie cardiaque..... p. 99

C. : LA RELAXATION AU COURS DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE..... p. 101

1) Chronologie des troubles mécaniques de la contraction et de la relaxation au cours de l'hypertrophie myocardique du rat..... p. 101

a - Indices $R_1$ et $R_2$ : définition..... p. 101

b - Les indices $R_1$ et $R_2$ chez le rat nouveau-né..... p. 103

c - Augmentation de $R_1$ après hypoxie myocardique..... p. 104

d - $R_1$ est fonction linéaire du coefficient A.isot/A.isom..... p. 104

2) Altérations des paramètres mécaniques de relaxation lors de l'hypertrophie cardiaque chez le rat..... p. 106

3) La "sensibilité de la relaxation aux variations de la charge" au cours de l'hypertrophie cardiaque... p. 107

CONCLUSION..... p. 109

PUBLICATIONS

- "Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction"
  Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN, V. CLAES, J. P. CHAMBARET, A. MIGUS, A. ANTONETTI and P. Y. HATT..... p. 127

- "Apport du laser à l'étude de la mécanique cardiaque"
  Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN, G. GRILLON, A. ANTONETTI and P. Y. HATT..... p. 155

- "Force-velocity-length relationship during cardiac hypertrophy. Time course of activation"
  Y. LECARPENTIER, P. GASTINEAU and P. Y. HATT..... p. 170

- "Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle"
  Y. LECARPENTIER, L. CHUCK, P. HOUSMANS, N. De CLERCK and D. L. BRUTSAERT..... p. 179

- "Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure"
  Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN, P. GASTINEAU and P. Y. HATT..... p. 185

- "La relaxation cardiaque au cours de l'hypertrophie myocardique chronique expérimentale : le rôle du réticulum sarcoplasmique"
  Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN, G. GRILLON, A. dos SANTOS, A. ANTONETTI and P. Y. HATT..... p. 192

- "Load sensitivity of relaxation in the foetal and newborn rabbit heart"
  J. A. HOERTER and Y. LECARPENTIER..... p. 209

- "Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction"
  K. SCHWARTZ, Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN, A. M. LOMPRE, J. J. MERCADIER and B. SWYNGHEDAUW..... p. 227

- "Mécanismes biochimiques de l'adaptation myocardique dans l'hypertrophie cardiaque"
  J. J. MERCADIER, Y. LECARPENTIER, C. DELCAYRE, A. M. LOMPRE, B. SWYNGHEDAUW and K. SCHWARTZ..... p. 232

- "Isoenzymic changes in myosin and hypertrophy ; adaptation during chronic mechanical overload"
  B. SWYNGHEDAUW, C. DELCAYRE, J. M. MOALIC, Y. LECARPENTIER, A. RAY, J. J. MERCADIER, A. M. LOMPRE, M. C. AUMONT and K. SCHWARTZ.p. 240

"One of the difficulties about muscle physiology is that of defining one's quantities in reasonably accurate physical and engineering terms. But we must try". (A. V. HILL, 1965).

## INTRODUCTION

Il faut probablement remonter à HARVEY W. pour retrouver les premiers fondements de ce qu'il est convenu d'appeler "la loi du coeur", lorsque celui-ci écrivait, en 1628, dans son traité "Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus" : "It is for this reason that the auricule is needed, that is to say, it has to help to infuse the blood into the ventricle so that the chamber in question may more readily express what has already been set in movement, and may send it on with greater vigour". Ces propos recèlent en partie le concept exprimé presque trois siècles plus tard par E. H. STARLING dans "The Arris and Gale Lectures" (1897). A la naissance de ce concept, contribuèrent M. BLIX (1892) et O. FRANK (1895) mais aussi les collaborateurs de STARLING : S. W. PATTERSON et H. PIPER (1914 a,b) : lorsque la pression de remplissage augmente, le débit cardiaque augmente. Un nouveau pas a été franchi lorsque B. ABBOTT et W. MOMMAERTS (1959) ont appliqué au coeur les concepts de physiologie musculaire développés par A. V. HILL (1949) sur le muscle squelettique.

Les deux dernières decennies ont apporté d'incontestables progrès dans la connaissance des mécanismes régissant l'activité mécanique du tissu cardiaque. Les travaux sur le muscle cardiaque isolé ont permis d'abou-

tir à un concept complexe définissant avec rigueur le "niveau de contractilité myocardique" et dont E. SONNENBLICK et coll (1962, 1965, 1967 a et b) et D. L. BRUTSAERT et coll (1969, 1971 a et b, 1974 a et b) furent d'actifs artisans. Ce concept nouveau intriquait simultanément plusieurs variables : la force, le raccourcissement et la vitesse de raccourcissement du muscle, le temps, avec des modifications de la longueur initiale du muscle et de la charge au cours de la contraction. Le niveau de contractilité fut défini comme une relation tridimensionnelle Force-Vitesse-Raccourcissement (F-V-L) "indépendante du temps", et de la longueur initiale. Toute modification de la performance myocardique se traduit par un changement de la relation F-V-L. Différents paramètres mécaniques permettaient préalablement à l'établissement de la relation F-V-L de mesurer l'activité contractile du muscle, comme la tension isométrique maximale et la vitesse maximale de raccourcissement extrapolée à charge nulle. Ces paramètres proviennent respectivement des relations bidimensionnelles Force-Longueur et Vitesse-Force et ne représentent que des cas limites de la relation tridimensionnelle qui s'avère plus générale car tenant compte simultanément d'un plus grand nombre de variables. L'application de ces notions au coeur entier ne reste pas sans soulever des difficultés en partie liées à l'extrême complexité de la géométrie ventriculaire, qui contraste avec l'apparente simplicité d'un muscle papillaire dont les fibres, dans l'ensemble sont orientées dans la même direction. Il n'en demeure pas moins que les études effectuées sur muscle papillaire ou trabécule isolés sont souvent à l'origine d'idées nouvelles reprises ultérieurement sur le coeur entier. On peut à titre d'exemple citer les travaux

initiés par D. L. BRUTSAERT (1978 a et b) sur la relaxation cardiaque et ses rapports avec la charge supportée par le muscle.

C'est aussi sur ce type de préparation que des corrélations entre les propriétés biochimiques et la performance mécanique ont été établies. Ainsi, N. ALPERT (1966) a montré qu'une baisse de l'activité ATPasique de la myosine était associée à des modifications de contractilité au cours de l'âge. De même au cours des surcharges myocardiques chroniques, la diminution de la vitesse maximale de raccourcissement est corrélée à la baisse de l'activité ATPasique de la myosine. B. SWYNGHEDAUW et collaborateurs établirent que les fondements de ce changement biochimique étaient liés à des modifications de la répartition des isoenzymes de la myosine cardiaque. Ainsi K. SCHWARTZ et collaborateurs (1982) montrèrent que la vitesse maximale de raccourcissement était directement liée au pourcentage d'isoenzyme $V_1$ de la myosine et indirectement au pourcentage d'isoenzyme $V_3$.

Le muscle cardiaque isolé représente donc une préparation de choix pour mettre en lumière les liens qui existent entre la structure histologique et les mécanismes biochimiques d'une part, et la fonction mécanique d'autre part. La corrélation la plus frappante entre structure histologique et fonction mécanique a été établie par A. M. GORDON, A. F. HUXLEY and F. J. JULIAN (1966) (Fig. 1) : ils montrèrent que la force développée par le muscle dépendait de la longueur des sarcomères et qu'elle était maximale lorsque celle-ci était comprise entre 2 et 2,2 µm. En deçà de 2 µm et au-delà de 2,2 µm, une analyse de la longueur des sarcomères montre sur la Figure 1 que le degré

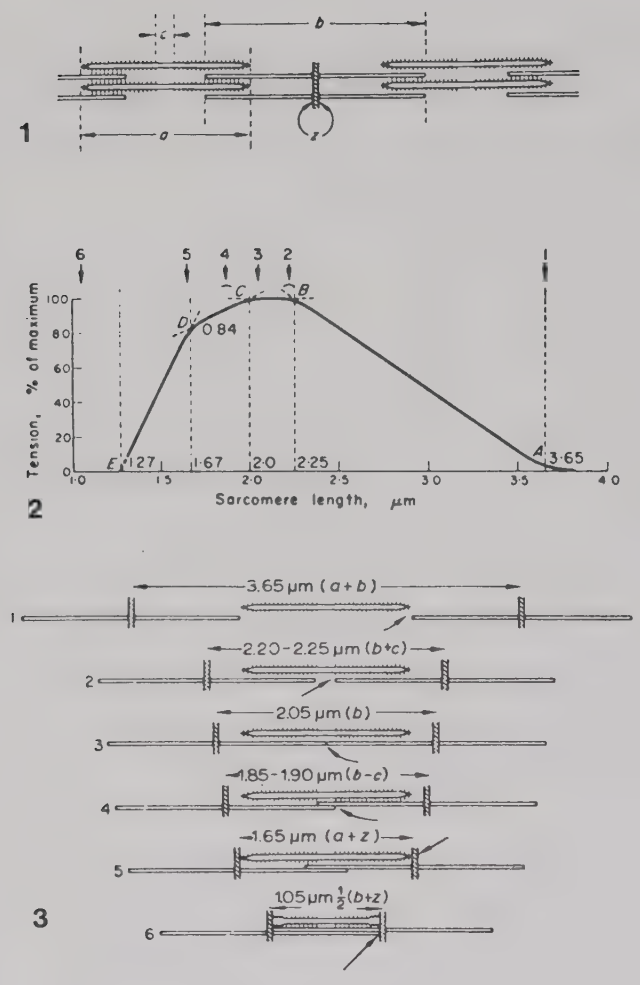



Fig. 1 : Théorie des filaments glissants - Courbe tension-longueur de Gordon, Huxley et Julian (1966) redessinée par Jewell (1974). (1) Disposition des myofilaments dans le muscle strié. Longueur du filament épais de myosine (a) : 1,60 µm. Longueur des filaments fins (actine + tropomyosine + troponine) (b) s'étendant de part et d'autre des lignes Z : 2,05 µm ; (2) Courbe tension-longueur d'une fibre musculaire squelettique ; (3) Les flèches numérotées représentent les stades critiques du degré de chevauchement des filaments fins et épais.

de chevauchement des filaments épais de myosine et fins d'actine diminue : la probabilité de formation de ponts actine-myosine diminue , et par suite, la force générée par le muscle aussi. C'était apporter plus d'un demi siècle après les travaux de STARLING et de ses collaborateurs un argument expérimental fondamental à l'appui de leurs propos visionnaires, repris ensuite par STARLING dans la "Linacre Lecture" (1918) :

"... the mechanical energy set free on passage from the resting to the contracting state depends on the area of chemically active surfaces, i.e. on the length of muscle fibres".

Le travail de GORDON et coll (1966) montre l'intérêt de la mesure de la longueur des sarcomères afin de mieux comprendre les rapports entre la structure et la fonction. Nous avons dans cette optique, mis au point une technique de mesure des sarcomères par diffraction laser, pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- quelles sont les relations entre la vitesse et la longueur des sarcomères d'une part, et la charge supportée par le muscle d'autre part ?
- quels sont les mécanismes qui président à la relaxation des sarcomères ?
- quelle unité pourrait-il exister d'un point de vue mécanique entre les muscles à structure sarcomérique cardiaque et squelettique ?
- le sarcomère représente-t-il une unité mécanique élémentaire comme il l'est d'un point de vue histologique au niveau ultrastructural ?

Dans un second chapitre, nous avons mis l'accent sur

les rapports entre le couplage excitation-contraction et le couplage inactivation-relaxation. Ce problème a été abordé (i) en étudiant l'évolution de la "sensibilité" que présente la phase de relaxation vis-à-vis des conditions de charge au cours du développement pré et post-natal ; (ii) en imposant de brusques et faibles variations de charges dans différentes préparations musculaires avec ou sans réticulum sarcoplasmique efficace ; (iii) en examinant l'influence de la charge sur la relaxation des sarcomères mesurés par diffraction laser.

Dans un troisième chapitre, nous avons étudié les effets de l'hypertrophie cardiaque induite par surcharge de pression et/ou de volume sur les propriétés mécaniques des phases de contraction et de relaxation. Diverses questions se sont posées :

- la relation biunivoque* entre la vitesse et la longueur, pour une charge isotonique donnée est-elle conservée au cours de l'hypertrophie myocardique ? Ce problème se pose à la lumière des diverses anomalies ultrastructurales mises en évidence au cours de l'hypertrophie cardiaque expérimentale chez le rat par P. Y. HATT et coll (1977 a, b ; 1979 a, b).
- La sensibilité de la phase de relaxation aux variations de conditions de charge est-elle modifiée lors des surcharges hémodynamiques chroniques ?
- Les rapports entre les couplages excitation-contraction et inactivation-relaxation, étudiés d'un point de vue mécanique sont-ils modifiés lors de l'hypertrophie cardiaque ?

* *Il existe une correspondance biunivoque ou une fonction bijective entre un ensemble E et un ensemble F si à tout élément de F correspond un et un seul élément de l'ensemble E.*

. Quelles corrélations a-t-on établi entre paramètres mécaniques et biochimiques dans le myocarde de rat normal hypertrophié ?

. Y a-t-il précession des altérations biochimiques (modifications en pourcentage de la répartition isozymique de la myosine) sur les anomalies de la contractilité ?

. Y a-t-il précession des modifications de la relaxation sur celles de la contraction ?

. Les changements isozymiques de la myosine au cours de l'hypertrophie myocardique représentent-t-ils un mode d'adaptation de la cellule soumise à de nouvelles conditions de charge ?

Les résultats expérimentaux présentés ci-dessus apportent une contribution partielle à la réponse de ces multiples problèmes dans un domaine de la cardiologie où il reste tant à faire encore.

# CHAPITRE I

## MESURE DES SARCOMERES EN TEMPS REEL PAR DIFFRACTION LASER.

La mesure en temps réel de la longueur des sarcomères s'avère être un paramètre mécanique de grande utilité. Nous avons vu l'apport essentiel du travail de A. M. GORDON et coll (1966) (Fig. 1) à la compréhension du phénomène décrit par E. H. STARLING. Les mesures de la longueur des sarcomères y sont effectuées sur un muscle se contractant isométriquement, c'est-à-dire sans raccourcissement. Cela représente d'un point de vue mécanique une condition très particulière de fonctionnement et il nous est apparu nécessaire de développer une méthode de mesure instantanée de la longueur des sarcomères sur un muscle se contractant indifféremment en mode isométrique et en mode isotonique à différents niveaux de charge.

### I-A. HISTORIQUE

RANVIER en 1874 réalisa les premières observations de mouvements des sarcomères sur le muscle squelettique. En effet il assimila pour la première fois le muscle strié à un réseau. Un réseau est une surface plane creusée de fins sillons parallèles et équidistants. Les réseaux possèdent la propriété de diffracter la lumière. Le spectre de diffraction est lié au pas du réseau selon les lois de la dif-

fraction que nous décrirons plus en détail au paragraphe I-B. Le muscle strié est composé de l'alternance régulière de bandes claires isotropes et sombres anisotropes composant les sarcomères. L'agencement régulier des sarcomères confère optiquement au muscle les propriétés de diffraction des réseaux et le sarcomère représente le pas du réseau. RANVIER (1874) écrivait : "le muscle en activité et dans tous les états intermédiaires entre le repos complet et la contraction la plus énergique, donne toujours des spectres". Cela montrait que les sarcomères conservaient au cours de la contraction un synchronisme élevé de raccourcissement. En effet le maintien d'une structure organisée en réseau est nécessaire à l'obtention de spectres de diffraction. RANVIER ne quantifia pas ses observations faute d'appareillage de mesure disponible à son époque. Il ne put obtenir de spectre de diffraction sur le muscle cardiaque et conclua que les fibres de ce tissu devaient probablement être agencées avec un certain degré de dispersion spatiale.

Cette voie nouvelle ouverte par RANVIER ne devait être reprise qu'un demi siècle plus tard. De nombreux auteurs, ayant alors acquis des appareillages de mesure adaptés, utilisèrent la diffraction de la lumière par le muscle squelettique pour calculer la longueur des sarcomères au repos et lors du raccourcissement musculaire : SANDOW (1936 a et b) ; BUCHTAL et KNAPPEIS (1940) ; ROME (1967) ; CLEWORTH et EDMAN (1969, 1972) ; GOLDSPINK (1970) ; KAWAI et KUNTZ (1973) ; PAOLINI et coll (1973, 1975, 1976, 1977) ; FUJIME (1975) ; BASKIN et coll (1979). Ces auteurs montrèrent que l'espacement des franges de diffraction constituait un index précis de mesure des sarcomères. Il en fut de même

pour le muscle cardiaque : NASSAR et coll (1974) ; KRUEGER et POLLACK (1975) ; POLLACK et KRUEGER (1976) ; KRUEGER et coll (1980 a et b) ; MANRING et coll (1976);ter KEURS (1980).

Ces auteurs ont mesuré par diffraction la longueur des sarcomères sur des muscles squelettique et cardiaque, au repos et lors de contractions isométriques et tétaniques. Nous en rappellerons maintenant les principaux résultats.

Une revue générale concise mais suffisante à la compréhension de l'essentiel sur ce sujet est exposée dans l'article "Apport du laser à l'étude de la mécanique cardiaque" (LECARPENTIER et coll, 1983 b), annexé à ce texte.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA MESURE DES SARCOMERES PAR DIFFRACTION

### 1) Au repos

#### a - Le muscle squelettique

##### α) Le muscle squelettique entier

Dans son travail princeps, RANVIER (1874) écrivit : "en prenant ces mesures sur des muscles de lapins et de grenouilles, tendus et non tendus à l'état frais et modifiés par des réactifs, je suis arrivé à trouver expérimentalement qu'il y a un rapport à peu près constant entre la largeur du spectre et le nombre des "sarcous éléments" contenus dans une longueur déterminée". Puis SANDOW (1936 a) observa que la longueur du sarcomère variait linéairement avec la longueur du sartorius de gre-

nouille lorsque celui-ci était étiré passivement, et cela pour des longueurs de sarcomère supérieures à 2,4 µm. Cette linéarité implique, selon l'auteur, que les variations passives de longueur sont distribuées uniformément parmi les sarcomères, le long du muscle. PAOLINI et ROOS (1975) ont confirmé que l'étirement passif du muscle sartorius de grenouille variait linéairement avec la longueur du sarcomère SL ($2,2\ \mu m < SL < 3,4\ \mu m$)

β) La fibre squelettique isolée

SANDOW (1936 a et b) montra que l'espacement des franges de diffraction obtenues à partir d'un réseau simple ou de la superposition de plusieurs réseaux de pas identique, était le même. BUCHTHAL et KNAPPEIS (1940) ont mis en évidence que le pas du réseau d'un muscle entier ou d'un nombre modéré de fibres musculaires ne différait pas de celui d'une fibre isolée unique de muscle semi-tendineux de grenouille. Les résultats sur la fibre musculaire squelettique isolée corroborèrent ceux observés sur le muscle entier. L'espacement des franges de diffraction y constitue une bonne mesure de la longueur des sarcomères (BUCHTHAL et KNAPPEIS, 1940 ; ROME (1967) ; KAWAI et KUNTZ, 1973).

b - Le muscle cardiaque

α) Le muscle cardiaque isolé.

NASSAR et coll (1974), à partir de fragments d'oreillette de grenouille, ont montré qu'au repos la longueur du sarcomère variait linéairement avec celle du muscle ($2,2\ \mu m < SL < 4\ \mu m$). Ce résultat est similaire à celui obtenu au niveau du muscle squelettique par SANDOW (1936) et PAOLINI et coll (1975).

β) Les myocytes isolés.

KRUEGER et coll(1980b) montrèrent que la longueur des sarcomères de cellules cardiaques isolées enzymatiquement par collagénase est, au repos, de 1,93 $\pm$ 0,10 µm. Ils n'en n'ont pas observé de modifications en fonction de la concentration extracellulaire de calcium (0,5 mM $< Ca^{2+} <$ 2 mM).

2) Lors d'une contraction isotonique ou isométrique.

Nous mentionnions ci-dessus que RANVIER (1874) observa que la structure en réseau du muscle se maintenait au cours de la contraction car les spectres de diffraction demeuraient visibles.

a - Le muscle squelettique

α) Le muscle squelettique entier.

Lors d'une contraction isométrique, l'amplitude de raccourcissement des sarcomères est d'environ 10 % de leur longueur initiale (SANDOW, 1936 b). Lors d'une contraction isotonique à charge modérée, survient un important raccourcissement des sarcomères d'environ 20 % de leur longueur initiale (au repos, SL = 2,48 µm ; au pic de contraction, SL = 2,02 µm). SANDOW (1936) confirma que le spectre restait quasiment aussi étroit et aussi net, lors de la contraction, qu'au repos, témoignant pour l'auteur d'un haut degré de synchronisme de raccourcissement des sarcomères. Cela suggère aussi que le degré de dispersion de la longueur des sarcomères n'est pas très important et qu'il n'augmente pas notablement au cours de la phase de raccourcissement.

β)La fibre squelettique isolée.

Lors d'une contraction faiblement chargée, le raccourcissement des sarcomères de muscle semi-tendineux de grenouille est d'environ 30 % de la longueur de repos

(BUCHTAL et KNAPPEIS, 1940). Lors d'une contraction isométrique CLEWORTH et EDMAN (1969) ont observé un raccourcissement des sarcomères de 2 % de leur longueur de repos ; dans les mêmes conditions isométriques, pour PAOLINI et coll (1977) le raccourcissement des sarcomères est d'environ 5 % de leur longueur initiale, indépendamment de celle-ci variant de 2,31 à 3,70 µm.

b - le muscle cardiaque

α) Le muscle cardiaque isolé.

En contraction isométrique et sur des trabécules de ventricule droit de rat (KRUEGER et POLLACK, 1975), l'amplitude moyenne du raccourcissement des sarcomères est d'environ 7 %, à la longueur optimale (Lmax), et devient légèrement plus importante pour des longueurs initiales inférieures à Lmax. (Lmax représente la longueur initiale du muscle pour laquelle la force isométrique développée est maximale). KRUEGER et POLLACK (1975) montrèrent que la diminution de la longueur des sarcomères, lors d'une contraction isométrique, était due à l'allongement de régions tendineuses très compliantes, situées aux extrémités de la préparation. Le degré de raccourcissement observé implique que la vitesse de raccourcissement des sarcomères, durant la contraction isométrique du muscle, soit relativement élevée. Un raccourcissement moyen des sarcomères de 12 % en 120 msec est équivalent à une vitesse moyenne de raccourcissement de 1 Lmax/sec. POLLACK et KRUEGER (1976) étudièrent en outre la vitesse de raccourcissement des sarcomères lors de diverses contractions à charge nulle partant de longueurs initiales différentes. Dans ces conditions, un degré donné de raccourcissement des sarcomères est atteint avec la même vitesse de raccourcissement mais à des instants différents. A charge nulle, il existe une relation bijective linéaire entre la

vitesse et le raccourcissement des sarcomères, indépendamment du temps et de la longueur initiale des sarcomères, pour des longueurs instantanées de ceux-ci comprises entre 1,6 et 2 µm.

POLLACK et coll (1977) ont observé que le raccourcissement des sarcomères se faisait selon un aspect en "marche d'escalier", avec des plateaux d'une dizaine de millisecondes durant lesquelles les sarcomères ne se raccourcissaient pas. L'interprétation de ce phénomène a été discutée par M. J. DELAY et coll (1981). RÜDEL et ZITE-FERENCZY (1979 a et b) expliquent la présence de ces plateaux par un phénomène de réflexion de Bragg. Des couches voisines de sarcomères dont la longueur est homogène au sein d'une même couche peuvent présenter une faible différence d'une couche à l'autre. Cette distribution discrète de longueur des sarcomères d'une couche à l'autre est la traduction d'une certaine dispersion de la longueur des sarcomères selon l'épaisseur du muscle.

β) Les myocytes isolés.

KRUEGER, FORLETTI et WITTENBERG (1980) calculèrent que l'amplitude du raccourcissement des sarcomères de myocytes isolés était du même ordre de grandeur que celle observée sur le muscle intact. La longueur moyenne des sarcomères au repos est de : 1,93 $\pm$ 0,10 µm. Au pic de contraction, elle est de 1,57 $\pm$ 0,13 µm. Le degré de raccourcissement moyen est donc d'environ 23 %. Il s'agit dans cette étude de contractions effectuées à charge nulle. D'autre part, l'amplitude maximale du raccourcissement des sarcomères est indépendante de la longueur initiale et de la concentration extracellulaire de calcium (cf. Tableau 1).

TABLEAU 1

| $[Ca^{++}]$ | SL au pic de raccourcissement | Pic de vitesse de raccourcissement |
|---|---|---|
| 0,5 mM | 1,57 ± 0,15 µm | 3,67 ± 1,47 µm/s |
| 1 mM | 1,56 ± 0,10 µm | 9,07 ± 3,74 µm/s |
| 2 mM | 1,59 ± 0,19 µm | - |

Par contre ce tableau montre que la vitesse de raccourcissement des sarcomères dépend de la concentration extra-cellulaire de calcium (cf. Tableau 1). Ce résultat observé sur une cellule isolée diffère de celui de POLLACK et KRUEGER (1976) sur trabécule de ventricule droit de rat. En effet, pour une même longueur initiale de sarcomère (SL = 1,8 µm), la vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères à charge nulle est de 4,3 µm/s dans les trabécules de ventricule droit de rat, alors qu'elle est de 9 µm/s dans les myocytes isolés.

3) Lors d'un tétanus isométrique.

a - Le muscle squelettique

α)Le muscle squelettique entier.

Lors d'un tétanus isométrique (CLEWORTH et EDMAN, 1972), le degré de raccourcissement des sarcomères est supérieur de quelques pour cent à celui observé lors d'une contraction isométrique simple dans le muscle squelettique de grenouille. Une amplitude de raccourcissement des sarcomères du même ordre de grandeur a été rapportée par PAOLINI et ROOS (1975) au cours du tétanus isométrique.

β)La fibre squelettique isolée.

CLEWORTH et EDMAN (1972), sur le muscle semi-tendineux de grenouille ont obtenu des résultats identiques à

ceux observés sur le muscle entier. KAWAI et KUNTZ (1973) ont montré qu'une stimulation tétanique isométrique provoquait un raccourcissement d'environ 22 nm par demi sarcomère. De plus l'amplitude maximale de raccourcissement des sarcomères augmente lorsque la longueur du sarcomère SL est comprise entre 2,2 et 2,6 µm et diminue lorsqu'elle est comprise entre 3,2 et 3,6 µm ; elle demeure en plateau lorsque SL varie de 2,6 à 3,2 µm.

b - Le muscle cardiaque

Tétaniser le muscle cardiaque est relativement plus délicat. HENDERSON et coll (1971) ont obtenu chez le rat un tétanus isométrique avec de la caféine ou un milieu riche en calcium. Chez le chat il est nécessaire d'associer à la caféine un milieu riche en calcium (FORD et coll, 1974). Il n'existe à ce jour pas de mesure des variations de la longueur des sarcomères sur muscle cardiaque tétanisé.

En conclusion, cette revue bibliographique concernant l'étude du raccourcissement des sarcomères étudié par diffraction révèle un certain degré d'hétérogénéité parmi les résultats, qui est en partie dû à la diversité des préparations utilisées et des conditions expérimentales. Malgré cela, l'ensemble des travaux examinés ci-dessus montre que la technique de diffraction constitue une bonne méthode de mesure du raccourcissement instantané du sarcomère. Il convient de noter que la plupart des travaux cités plus haut relatent le comportement mécanique des sarcomères en mode isométrique. Quelques uns étudient la contraction des sar-

comères sur un muscle faiblement chargé ou même à charge nulle. Mais nous n'avons quasiment pas d'information sur la mécanique des sarcomères du muscle squelettique ou cardiaque chargé à tous les degrés de charge possible entre la charge nulle et la contraction isométrique.

Une étude bibliographique détaillée selon le même schéma et traitant des variations d'intensité et de dispersion des spectres de diffraction serait possible. Afin d'alléger un paragraphe qui deviendrait alors trop aride, nous appellerons au fur et à mesure des besoins de la discussion les références traitant de l'intensité et de la dispersion des franges de diffraction. Les méthodes d'étude de la dispersion ont spécialement été étudiées par V. A. MARIKHIN et coll (1970).

## I-B. TECHNIQUE DE LA MESURE DYNAMIQUE DES SARCOMERES PAR DIFFRACTION LASER

Les muscles striés, cardiaque et squelettique, diffractent la lumière parce qu'ils ont une structure suffisamment régulière pour se comporter optiquement comme des réseaux et parce que la dimension de l'unité élémentaire de ce "réseau musculaire", c'est-à-dire le sarcomère, est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de la source lumineuse. Nous exposerons les principes généraux de la technique de diffraction et les particularités de notre méthode en développant plus spécialement les points qui n'ont pas, ou peu, été traités dans les deux articles : "Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction" et "Apport du laser à l'étude de la mécanique cardiaque" (LECARPENTIER et coll, 1983 b).

## 1 - RAPPEL HISTOLOGIQUE DE LA CONSTITUTION DES SARCOMERES.

La cellule musculaire striée est entourée d'une membrane appelée sarcolemne. L'intérieur de la cellule comprend le tissu contractile proprement dit et un certain nombre d'éléments essentiels participant à son métabolisme et à la régulation de la contraction (noyau, mitochondries, ribosomes, réticulum sarcoplasmique). Le tissu contractile est composé de myofibrilles, elles-mêmes disposées régulièrement en fibres. Au microscope optique ou électronique, l'aspect strié est dû à l'alternance régulière de bandes claires isotropes (I) et de bandes sombres anisotropes (A) (Figure 2). Les bandes claires I sont séparées en leur milieu par une ligne plus sombre appelée ligne Z. Le sarcomère est la région comprise entre deux lignes Z. Le sarcomère comporte donc une bande sombre ayant de part et d'autre d'elle une demi-bande claire (Figure 2).

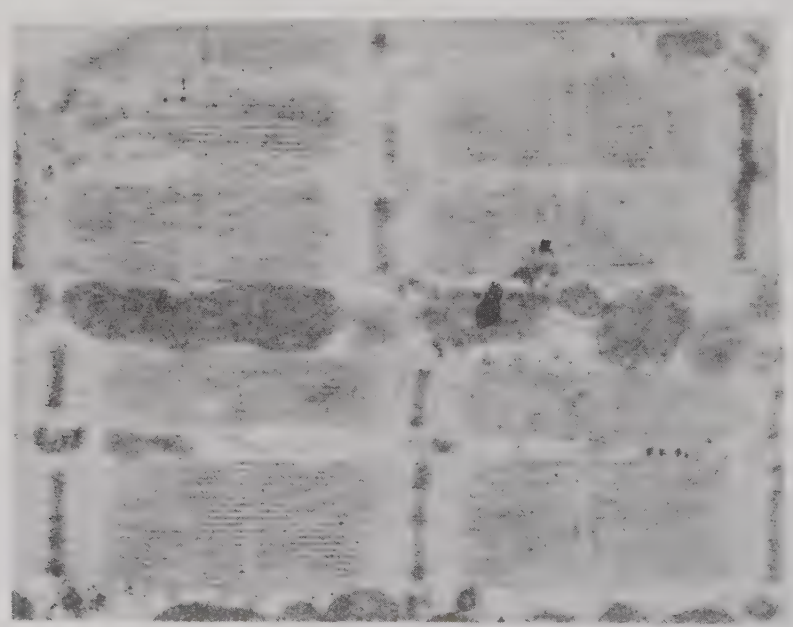


FIG.2

Deux protéines contractiles de structure composent les sarcomères. D'une part l'actine ou filament fin, elle-même composée de deux hélices de monomères d'actine G (PM = 47.000) polymérisés en actine F. Les filaments fins d'actine mesurent 1 µm de long et s'insèrent sur les lignes Z (Figure 3 A). D'autre part la myosine ou filament épais (PM = 500.000) est composée de deux parties : une partie allongée et une partie globulaire (composée de deux têtes semblables). Cette partie globulaire (subfragment HMM-$S_1$) joue un rôle essentiel dans la régulation de la contraction cardiaque car c'est à ce niveau que siège l'activité ATPasique de la myosine, et que la molécule d'actine se fixe à celle de myosine, permettant la constitution des ponts actine-myosine. La rotation des têtes de la myosine ainsi fixée à l'actine engendre un raccourcissement selon l'axe longitudinal de la molécule de myosine avec glissement progressif des filaments minces entre les filaments épais (théorie des filaments glissants d'HUXLEY). Le calcium joue dans ce mécanisme un rôle essentiel. En effet, en se fixant sur la troponine C, il provoque un changement conformationnel de celle-ci et une modification spatiale des protéines contractiles régulatrices (tropomyosine et complexe troponine), ce qui précisément libère au niveau de l'actine les sites sur lesquels viennent se fixer les têtes de la myosine.

## 2 - RAPPEL PHYSIQUE SUR LE PHENOMENE DE DIFFRACTION.

Lorsque des ondes lumineuses éclairent un écran percé d'une ouverture ou d'une fente de dimension suffisamment petite et de même ordre de grandeur que les ondes lumineuses, il se produit un phénomène de diffraction de la lumière. On constate en effet que l'on peut observer de la lumière dans un espace plus large que ne le prévoit l'optique

géométrique classique. Lorsqu'on éclaire n fentes identiques et régulièrement espacées au lieu d'une seule, la lumière diffractée par ces n fentes donne naissance à la superposition de plusieurs champs d'interférences (voir Figure 1 A, B et C dans l'article "Apport du laser à l'étude de la mécanique cardiaque"). On observe alors des directions privilégiées où l'intensité de la lumière diffractée est maximum et d'autres directions où il y a extinction de la lumière. Les franges de diffraction correspondant aux zones d'intensité maximale sont équidistantes et parallèles aux fentes. Ces franges apparaissent dans des directions pour lesquelles la différence de marche $\delta$ des ondes lumineuses diffractées par les fentes est un multiple entier k de la longueur d'onde : $\delta = \pm k\lambda$. Il existe une relation très simple entre la distance séparant deux fentes consécutives, la longueur d'onde de la lumière et l'espace interfrange (dite relation de Bragg) : $SL. \sin \Theta = \pm k\lambda$, (SL : distance entre deux fentes consécutives, $\Theta$ : direction dans laquelle est vue la frange de diffraction par rapport au rayon incident, $\lambda$ : longueur d'onde de la lumière et k : ordre de la frange de diffraction). La source lumineuse utilisée est une source laser Hélium-Néon (faisceau monochromatique cohérent).

## 3 - APPORT D'UNE SOURCE LASER DANS LA FACILITATION DE L'ANALYSE DES IMAGES DE DIFFRACTION.

L'utilisation du laser présente un certain nombre d'avantages par rapport aux sources conventionnelles non cohérentes : (i) il s'agit d'un faisceau parallèle de très faible divergence ; (ii) la monochromaticité permet d' obtenir des franges fines et contrastées et permet une grande précision dans la mesure de la longueur des sarcomères et dans

celle de la dispersion de cette longueur, aussi bien au repos que durant la phase de raccourcissement. L'utilisation d'une source de lumière blanche donnerait un spectre de diffraction beaucoup plus large dont l'analyse serait très complexe, chaque longueur d'onde diffractant selon une direction précise. Le spectre de diffraction obtenu avec un laser n'est constitué que des franges spectrales correspondant à la longueur d'onde de celui-ci et non de celles correspondant à la superposition de l'ensemble des longueurs d'onde du continuum formant la lumière blanche. Enfin, aux faibles énergies utilisées (quelques mW), la source laser n'interfère pas dans les mécanismes biochimiques régulateurs de la contraction musculaire, ni de manière plus générale dans le métabolisme de la cellule musculaire squelettique ou cardiaque.

## 4 - LE MUSCLE STRIE ASSIMILABLE A UN RESEAU.

Le muscle strié myocardique ou squelettique vis-à-vis de la lumière se comporte comme un "réseau optique", ou, ce qui revient au même, comme une succession de plusieurs fentes identiques et régulièrement disposées. Cela est dû, comme nous le rappelions plus haut, à la striation régulière alternant périodiquement des bandes claires transparentes à la lumière (bandes I isotropes) et des bandes sombres opaques à la lumière (bandes A anisotropes). En fait, les bandes isotropes I constituées de filaments fins représentent l'équivalent des fentes décrites ci-dessus. La dimension de ces bandes claires lorsque le muscle est au repos est d'environ 0,6 µm. En éclairant le muscle avec un laser Hélium-Néon de longueur d'onde $\lambda = 633$ nm et donc de même ordre de grandeur que la dimension des bandes I, on observe des franges de diffraction. La Figure 4 montre

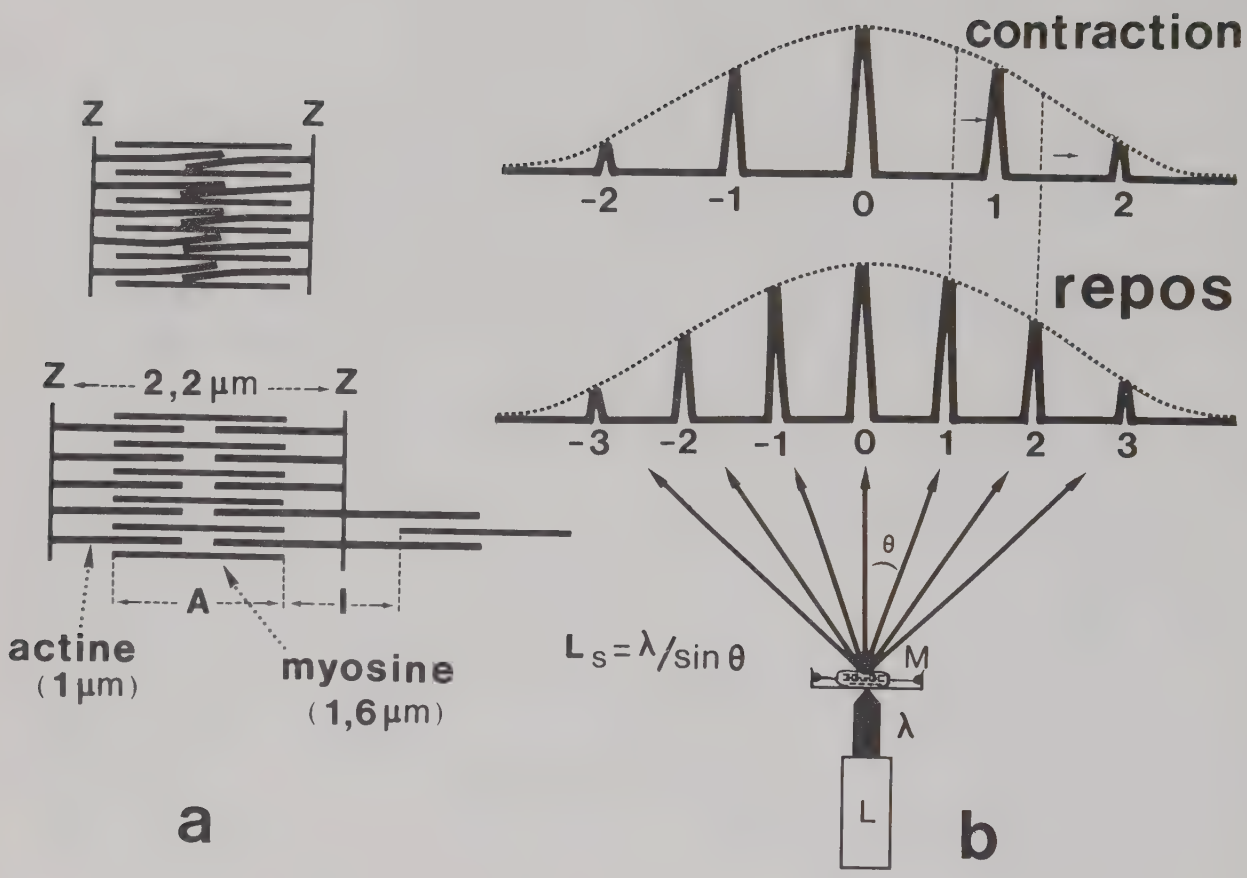

Z
Z
Z
2,2 µm
Z
A
I
actine
(1 µm)
myosine
(1,6 µm)
a
contraction
-2
-1
0
1
2
repos
-3
-2
-1
0
1
2
3
θ
$L_s = \lambda / \sin\theta$
M
λ
L
b

FIG.3

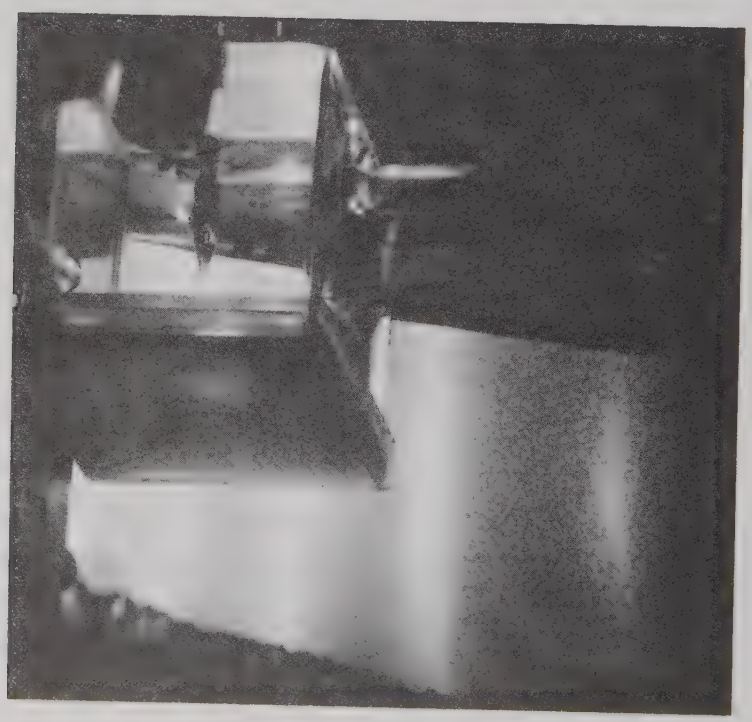


FIG.4

des franges de diffraction équidistantes entr'elles obtenues à partir de muscle squelettique. On y distingue une frange centrale très brillante d'ordre 0 ($k = 0$) avec de part et d'autre des franges d'ordre $\pm 1$ ($k = 1$) et $\pm 2$ ($k = 2$). L'intensité des franges décroît au fur et à mesure que l'ordre de diffraction croît (Figures 3 B et 4). Il suffit de connaître l'espace interfrange pour en déduire immédiatement, par la relation de Bragg, la distance qui sépare deux fentes consécutives. En l'occurence, cette distance correspond à la longueur d'un sarcomère qui constitue l'unité élémentaire ou pas du "réseau musculaire". Lorsque le muscle se contracte, les filaments fins d'actine glissent entre les filaments épais de myosine et les lignes Z se rapprochent l'une de l'autre (Figure 3 A). En fait, le filament épais de myosine demeure de longueur constante ; donc les bandes sombres A restent aussi de longueur constante. Le raccourcissement des fibres se fait uniquement au détriment des fentes claires I. La diminution de longueur des sarcomères aboutit à un déplacement des franges de diffraction qui tendent à s'écarter de leur position de repos car l'angle $\theta$ augmente (Figure 3 B). Celles-ci reviennent progressivement à leur position de repos, lors de la phase de relaxation.

## 5 - PREPARATIONS ET MATERIELS BIOLOGIQUES.

a - Deux types de préparation musculaire ont été utilisés :

(i) le muscle sartorius entier prélevé sur des grenouilles Rana Esculenta ($n = 30$) ;

(ii) de fines trabécules ou des muscles papillaires très minces prélevés dans le ventricule droit de rat Wistar adulte ($n = 10$).

b - Les grenouilles sont préalablement décérébrées avant le prélèvement du sartorius. Les rats sont anesthésiés très légèrement à l'éther. Le coeur est rapidement extrait du thorax et perfusé selon la méthode de Langendorff par du liquide de Krebs-Ringer-Henseleit bien oxygéné. Une fine trabécule est ensuite excisée du ventricule droit. La technique de prélèvement et les conditions expérimentales (composition des solutions, pH, température, fréquence de stimulation, etc...) sont explicitées plus en détail dans l'article "Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction".

L'une des différences importantes entre les deux types de préparation réside en leur taille respective. Le sartorius de la grenouille mesure environ deux centimètres et les trabécules de ventricule droit du rat, environ deux millimètres. L'appareillage optique et électronique mesurant le déplacement des franges de diffraction (pour les deux muscles) repose sur le même principe. La faisabilité de l'étude a été effectuée sur le muscle squelettique sartorius de la grenouille pour deux raisons : (i) la grande taille du muscle ne nécessite pas de focaliser la source laser, (ii) l'agencement particulièrement régulier des fibres permet d'obtenir aisément des franges de diffraction fines, nettes et brillantes. Dans un second temps, et pour des raisons de taille des échantillons biologiques, il a fallu miniaturiser le système optique et l'adapter à un microscope inversé pour l'étude des sarcomères de trabécule cardiaque.

6 - LE DIFFRACTOMETRE

a - Montage optique.

Nous avons vu au paragraphe I-B.3 que le muscle strié, se comportant optiquement comme un réseau, diffractait la lumière selon des directions privilégiées. Au cours de la contraction, les franges de diffraction s'écartent et l'angle $\Theta$ de la Figure 3 B augmente. Le principe de la mesure consiste à étudier les variations de $\Theta$ au cours du cycle contraction-relaxation. On en déduit les variations de longueur des sarcomères par la relation de Bragg $SL = \lambda / \sin\Theta$.

Le schéma du montage optique et électronique de la première génération de diffractomètre adapté au muscle squelettique sartorius de la grenouille est représenté sur la Figure 5.

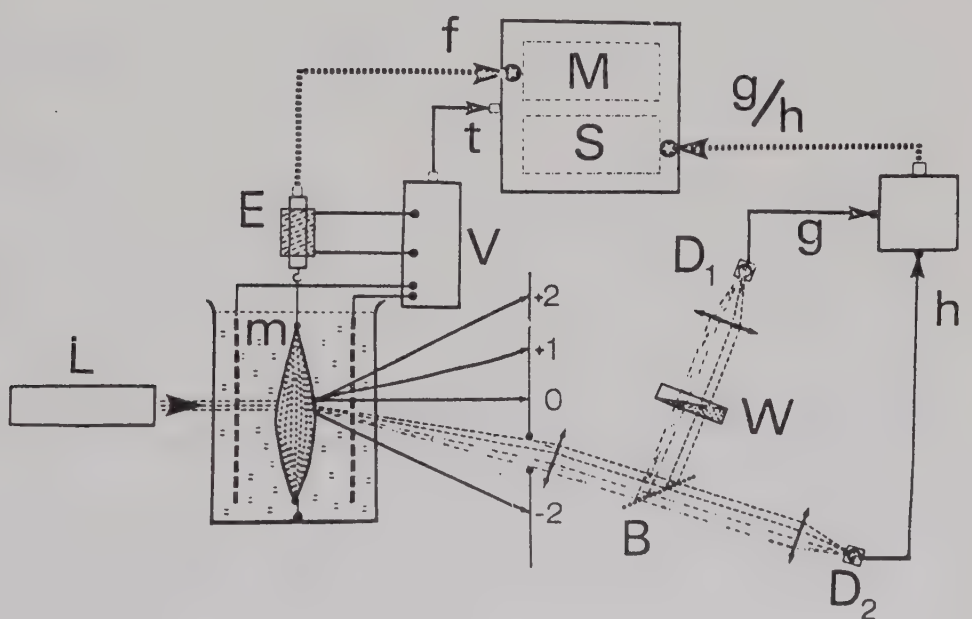



FIG.5

Le muscle (m) est transilluminé perpendiculairement par un laser Hélium-Néon ($\lambda$ = 632 nm, 5 mW). La structure régulièrement striée du muscle provoque une diffraction de la lumière selon plusieurs ordres : $\pm$ 1, $\pm$ 2. Les franges de même ordre et de signe opposé sont symétriques par rapport à la frange d'ordre zéro. Un diaphragme permet de ne laisser passer que la frange d'ordre -1. Une lentille convergente, dont le foyer objet est situé au centre du muscle, rend parallèle le faisceau de la frange -1. Une lame semi (B) divise le faisceau en deux parties égales. Une lentille permet de faire converger la partie du faisceau traversant la lame semi (B) sur une photodiode $D_2$ (PIN 10) donnant un signal électrique h . Sur l'autre voie, le système est similaire et la lumière converge sur une photodiode $D_1$ (PIN 10), convertissant le signal optique en un signal électrique g. Sur cette voie est interposé en outre un coin densitométrique (W) dont la transmission varie exponentiellement selon la position du faisceau sur le coin. La photodiode $D_2$ mesure la variation d'intensité de la frange au cours du cycle contraction-relaxation ; la photodiode $D_1$ mesure un signal plus complexe, captant comme la photodiode $D_2$ la variation d'intensité de la frange, mais aussi une variation supplémentaire d'intensité due à l'interposition du coin densitométrique (W) sur cette voie. Celle-ci est liée au déplacement du faisceau sur le coin densitométrique, lui-même lié à la variation de $\Theta$ et par là-même à la variation de longueur des sarcomères. Un diviseur analogique permet de diviser g par h. Le résultat de cette division ne tient donc compte que de l'influence du coin densitométrique, elle-même liée comme nous venons de le voir à la variation de longueur des sarcomères. L'avantage de ce système est de s'affranchir des variations d'intensité de la frange de diffraction au cours de la contraction. Le signal g/h est mathématiquement lié à la longueur du sarcomère par une relation relativement complexe que nous allons montrer. Soit un laser Hélium-Néon (Fig. 6) d'intensité Io, dont le faisceau arrive perpendiculairement sur le "réseau muscu-

laire" R. La frange de diffraction d'ordre 1 fait un angle $\Theta o$ au repos. Lors de la phase de contraction, le pas du réseau R diminue et la frange s'écarte d'un angle $\Delta\Theta$, ce qui correspond à un déplacement $\delta$ du faisceau après passage à travers la lentille $L_f$ de distance focale f (f = 100 mm).

- soit :

  . L : la longueur du coin densitométrique W (5 mm)

  . k : le coefficient de transmission de W ($5.10^{-2}$/mm)

  . $x_o$ : la position de la frange sur W correspondant à l'angle $\Theta o$

  . $\delta$ : le déplacement de la frange sur W au cours de la contraction

  . $T(\delta)$ : la transmission de la lumière par le coin densitométrique W

. Au repos la transmission To dans W est égale à :

$$To = 10^{-k(L-x_o)}$$

. A la position $x_o + \delta$ :

$$T(\delta) = 10^{-k(L-x_o-\delta)} = To.10^{+k\delta} \qquad (1)$$

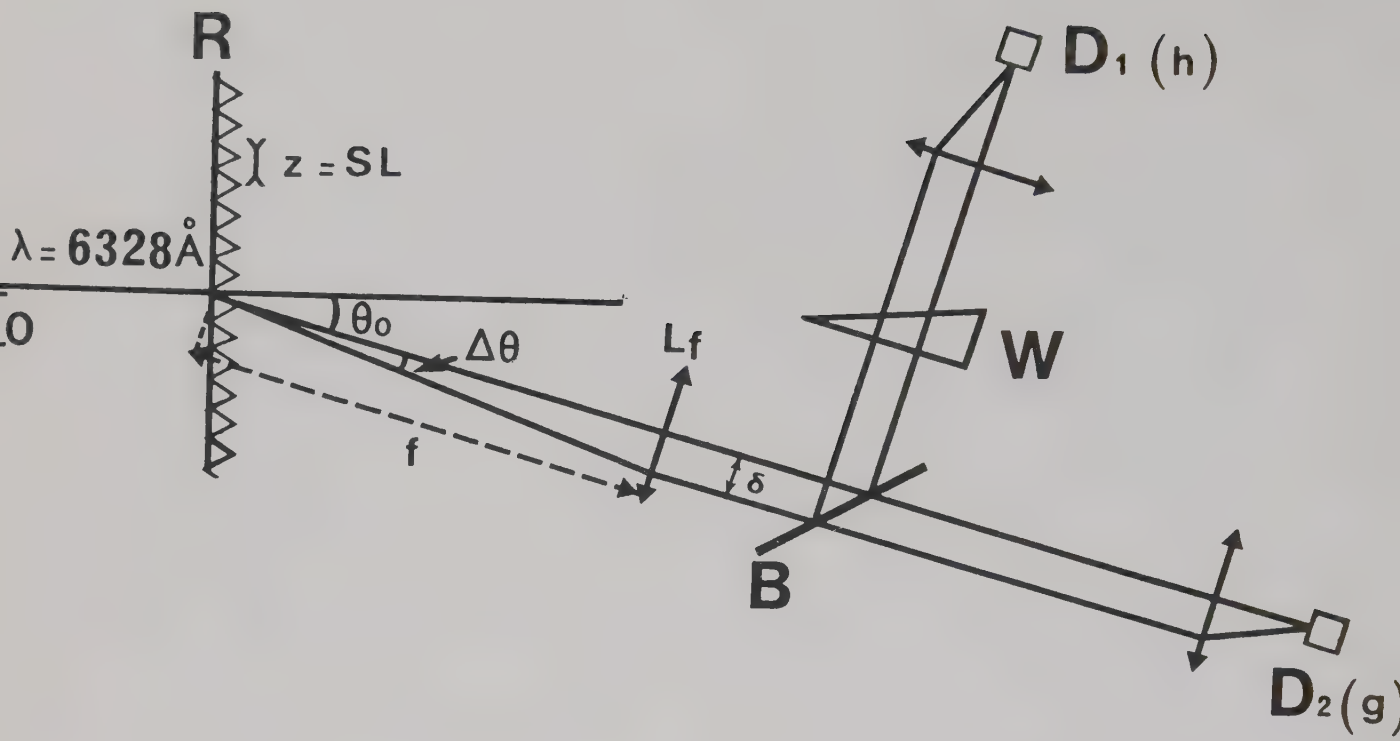
- soit :

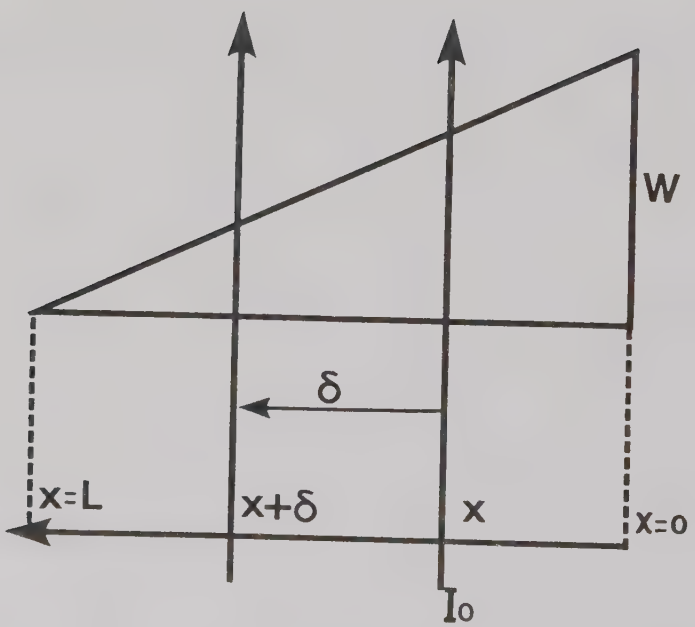
  . $k_A$ et $k_B$ : les caractéristiques opto-électroniques des photodiodes $D_2$ et $D_1$ respectivement

  . $T_L$ : le coefficient de transmission de la lame B

  . $R_L$ : le coefficient de réflexion de la lame B

  . $I(\Theta)$ : la variation d'intensité de la frange en fonction de la variation de $\Theta$ au cours de la phase de contraction




DETAIL DU COIN
DENSITOMETRIQUE W

FIG.6

Les photodiodes $D_1$ et $D_2$ convertissent respectivement le signal lumineux qu'elles reçoivent en un signal électrique $i_1$ et $i_2$ :

$$i_1 = k_B \times Io \times I(\Theta) \times R_L \times T(\delta) = g$$

$$i_2 = k_A \times Io \times I(\Theta) \times T_L = h$$

Le diviseur analogique effectue la division

$$S = \frac{i_1}{i_2} = \frac{g}{h}$$

$$S = \frac{k_B \times R_L}{k_A \times T_L} \quad T(\delta)$$

Or les deux photodiodes $D_1$ et $D_2$ ont les mêmes caractéristiques opto-électroniques : $k_A = k_B$ ; d'autre part la lame B est une lame semi 50-50 d'où $R_L = T_L$ ; donc $S = T(\delta)$

De l'expression (1), on tire

$$S = T(\delta) = To\ 10^{k\delta} \qquad (2)$$

. Au repos $\delta = o$ ; le signal So alors donné par le diviseur analogique est :

So = To d'où l'on déduit

$$\boxed{S = So\ 10^{k\delta}} \qquad (3)$$

- soit z le pas du "réseau musculaire" ($z = SL$)

La relation de Bragg s'écrit $z = \frac{\lambda}{\sin \Theta}$

$$\Theta = \Theta o + \Delta\Theta = \text{Arc sin } \frac{\lambda}{z} = \Theta o + \text{Arc tg } \left(\frac{\delta}{f}\right)$$

$$\Theta o = \text{Arc sin } \frac{\lambda}{z_o}$$

$$\text{donc } \frac{\delta}{f} = \text{tg } \left[\text{Arc sin } \frac{\lambda}{z} - \text{Arc sin } \frac{\lambda}{z_o}\right]$$

(3) peut s'écrire $k\delta = \log \frac{S}{So}$

d'où : $\delta = \frac{1}{k} \log \frac{S}{So} = f\ tg \left[ Arc\ sin \frac{\lambda}{z} - Arc\ sin \frac{\lambda}{z_o} \right]$

$Arc\ sin \frac{\lambda}{z} - Arc\ sin \frac{\lambda}{z_o} = Arc\ tg \left[ \frac{1}{kf} \log \frac{S}{So} \right]$

$$\frac{\lambda}{z} = \sin \left[ Arc\ tg \left( \frac{1}{kf} \log \frac{S}{So} \right) + Arc\ sin \frac{\lambda}{z_o} \right]$$

$$z = \frac{\lambda}{\sin \left[ Arc\ tg \left( \frac{1}{kf} \log \frac{S}{So} \right) + Arc\ sin \frac{\lambda}{z_o} \right]}$$

or $Arc\ sin \frac{\lambda}{z_o} = \Theta o$

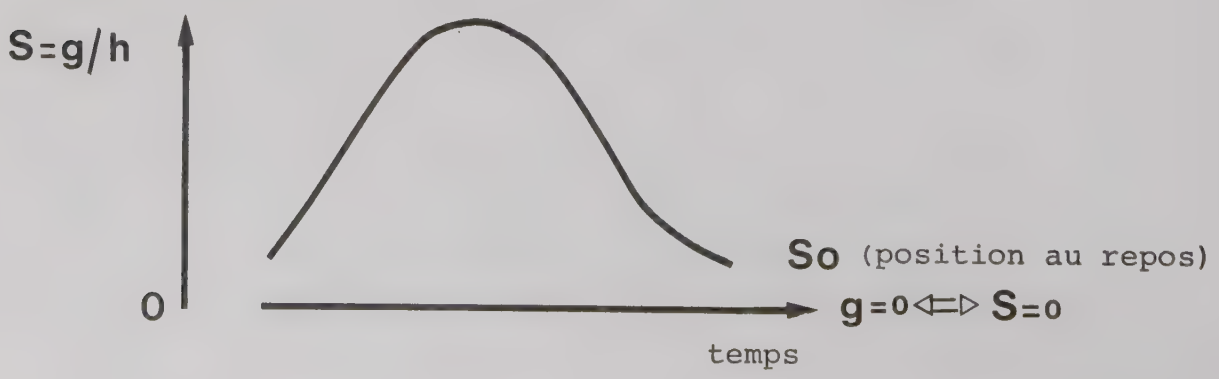
donc
$$\boxed{z = \frac{\lambda}{\sin \left[ \Theta o + Arc\ tg \frac{1}{kf} \log \frac{S}{So} \right]}} \qquad (4)$$

La relation (4) entre la longueur instantanée du sarcomère z et le résultat de la division analogique S = g/h n'est pas linéaire et nécessite un traitement informatique pour obtenir z en fonction de S.

kf est une constante du système optique égale à 6,5 pour le muscle cardiaque et à 8 pour le muscle squelettique.

La longueur de repos du sarcomère $z_o$ d'où l'on calcule $\Theta o$ par la relation de Bragg est directement mesurée sur le moniteur TV à l'aide de réseaux calibrés (Jobin et Yvon).

La ligne de base S = 0 est obtenue en masquant la photodiode $D_1$ : la division g/h s'annule, le numérateur g étant nul. So est la valeur de la division g/h au repos, par rapport à la ligne de base.



La relation (4) peut se mettre sous une forme légèrement différente permettant d'obtenir directement le pourcentage de raccourcissement des sarcomères $\Delta z = \frac{z_o - z}{z}$ par rapport à leur valeur de repos $z_o$, en fonction de S

$$\frac{z}{z_o} = \frac{\sin \Theta o}{\sin\left[\Theta o + \text{Arc tg} \frac{1}{kf} \log \frac{S}{So}\right]}$$

$$\boxed{\Delta z = 1 - \frac{\sin \Theta o}{\sin\left[\Theta o + \text{Arc tg} \frac{1}{kf} \log \frac{S}{So}\right]}} \qquad (5)$$

b - <u>Influence de la longueur de la frange sur la lumière transmise par le coin densitométrique W</u>

La longueur des sarcomères présente un certain degré de dispersion. Cela se traduit par le fait que les franges de diffraction sont relativement larges. Au cours de la contraction, la dispersion augmente légèrement et par conséquent, la largeur de la frange étudiée augmente aussi. Si la largeur de la frange devenait trop grande, cela induirait une erreur sur la mesure des sarcomères, erreur que nous allons expliciter. En effet W transmettrait de façon plus importante une moitié de la frange que l'autre moitié.

Soit x la position médiane de la frange sur le coin W et 2 $\Delta$F la largeur totale de la frange (Figure 7). On suppose que le front d'entrée de la frange sur le coin est rectangulaire.

La transmission du coin à la position x est :

$I(x) = 10^{kx} = \exp^{k'x}$

$k' = 2,3\ k$

$k = 6,5\ \%$ (constante caractéristique du coin W).

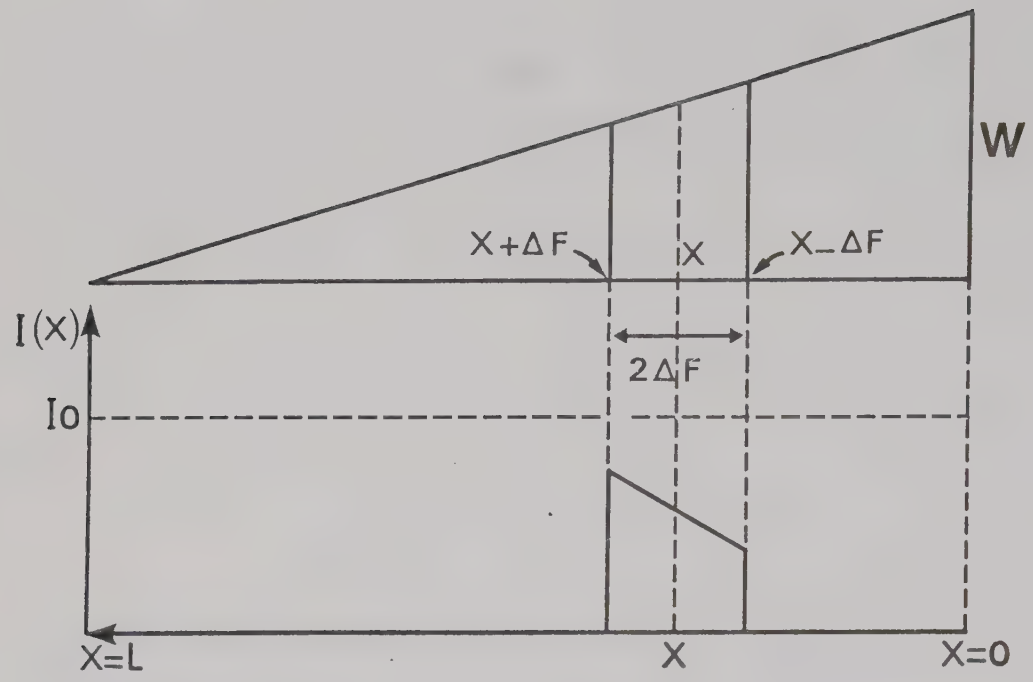



FIG.7

A l'entrée du coin W, le flux lumineux est :

$$Eo = 2\ \Delta F\ Io$$

A la sortie du coin W, le flux lumineux est :

$$E = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x)\ \exp k'\ x = \int_{-\Delta F}^{+\Delta F} Io\ \exp k'x\ dx$$

$$E = \frac{Io}{k'}\left[\exp k'\ \Delta F - \exp\ (-k'\ \Delta F)\right]$$

$$E = \frac{2\Delta F\ Io}{2\Delta F\ k'}\left[\exp k'\ \Delta F - \exp\ (-k'\ \Delta F)\right]$$

$$E = 2\ \Delta F\ Io\ \left[\frac{sh\ k'\ \Delta F}{k'\ \Delta F}\right] = Eo\ \frac{sh\ k'\ \Delta F}{k'\ \Delta F}$$

$$\boxed{E = Eo\frac{sh\ (k'\Delta F)}{k'\ \Delta F}} \qquad (6)$$

$k' = 0,065 \times 2,3 = 0,15$

$2\,\Delta F \sim 1$ mm

En supposant que la largeur de la frange double, ce qui représente une estimation par excès, l'erreur relative est :

$$\frac{Eo - E}{Eo} = 1 - \frac{sh\ (k'\ \Delta F)}{k'\ \Delta F} = 1 - \frac{sh\ 0,3}{0,3} < 2.10^{-3}$$

L'erreur relative est inférieure à 2 °/₀₀ ce qui est très faible par rapport à l'erreur inhérente à la chaîne électronique d'amplification. Elle peut par conséquent être négligée. L'élargissement de la frange n'entraîne donc pas d'erreur significative sur la mesure du raccourcissement des sarcomères par cette méthode.

c - Enfin il faut tenir compte de l'indice de réfraction de l'eau par rapport à l'air (n = 1,3) lorsque le faisceau diffracté sort de la cuve, en appliquant la loi de Descartes sin i = n sin r entre le rayon incident et le rayon réfracté. Cela a été pris en compte dans le calcul de la longueur des sarcomères.

## 7 - LA CHAINE D'AMPLIFICATION ELECTRONIQUE DES SIGNAUX OPTIQUES

Le signal électrique issu des photodiodes $D_1$ et $D_2$ est très faible et nécessite l'utilisation d'une chaîne d'amplification. Le signal lumineux parvenant sur les détecteurs a un spectre de 0 à 2 KHz et permet au détecteur de délivrer un signal de l'ordre de quelques dizièmes de microampère. D'un muscle à l'autre, le rapport des intensités

lumineuses des franges de diffraction peut varier de 1 à 20. Afin de pouvoir faire l'acquisition correcte de ces signaux, la chaîne d'amplification est composée pour chacune des voies $D_1$ et $D_2$ :

1) d'un préamplificateur à faible bruit, convertisseur courant-tension ayant une bande passante de 6 KHz à -3 dB,

2) d'un amplificateur à gain et offset variables pour régler de façon optimale la chaîne amplificatrice,

3) à la sortie de ces deux chaînes, nous disposons de signaux corrects en amplitude et valeur de base. Ces signaux vont sur un diviseur analogique qui effectue le rapport g/h avec une distorsion de l'ordre de 1 pour cent. Les conditions de fonctionnement du diviseur imposent 1 V $< |g|$ et $|h| < 9$ V. Le temps de réponse du diviseur est 1 µs et sa bande passante en grands signaux > 10 KHz.

4) Le rapport g/h est envoyé sur un dérivateur qui dérive tout le spectre du signal utile recueilli sur les photodiodes (jusqu'à 20 KHz).

La chaîne dans son ensemble est telle qu'elle n'altère à aucun moment les signaux qui lui sont appliqués.

## 8 - PRECISION DE LA MESURE

La précision de la mesure de la longueur des sarcomères est limitée par la chaîne amplificatrice et le diviseur. Elle est de l'ordre de 1 %. La mesure des sarcomères est donc connue avec une précision de l'ordre de 200 Å.

9 - MESURES DE LA FORCE ET DU RACCOURCISSEMENT DES MUSCLES

Les caractéristiques électroniques des transducteurs de force sont décrites dans l'article : "Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction" en ce qui concerne les fines trabécules de ventricule droit de rat, et par D. L. BRUTSAERT et V. CLAES (1974) et Y. LECARPENTIER (1982) en ce qui concerne les muscles papillaires de ventricule gauche de rat et le muscle squelettique sartorius de la grenouille.

## I-C. RESULTATS

L'appareillage optique et électronique permet de mesurer en temps réel :

- le raccourcissement des sarcomères (SL)
- la vitesse de raccourcissement des sarcomères (SV)
- la force du muscle (MF)
- le raccourcissement du muscle (ML)
- la vitesse de racccurcissement du muscle (MV).

Ces cinq variables sont enregistrées en fonction du temps, et deux à deux en X-Y, en particulier selon le plan de phase vitesse-raccourcissement (dit en Lissajou).

. La précharge est la charge qui détermine la longueur initiale du muscle.

. La postcharge est une charge supplémentaire à la précharge que l'on peut imposer au muscle. Un stop électronique empêche que l'adjonction de cette charge supplémentaire étire le muscle et modifie sa longueur initiale.

. La charge totale est la somme de la précharge et de la postcharge. C'est la charge que doit vaincre le muscle avant de commencer sa phase de raccourcissement.

Précharge, postcharge et charge totale se définissent aisément sur les préparations linéaires et de dimensions relativement faibles que nous utilisons. Cela n'est plus le cas sur le coeur entier dont la géométrie complexe rend ces concepts plus difficiles à appréhender.

Chronologiquement, nous avons obtenu nos premiers résultats de mesure des sarcomères en temps réel sur le muscle squelettique sartorius de la grenouille

1 - Sur le muscle squelettique :

a - La phase de contraction des sarcomères.

La figure 8 montre quatre contractions : a, b, c et d. La contraction a est uniquement préchargée à 0,5 g. Les deux contractions b et c sont postchargées. La contraction d est effectuée de sorte que le muscle ne se raccourcisse pas : le muscle entier est maintenu en "isométrie". Cette figure montre que l'amplitude de raccourcissement du sarcomère dépend de la charge et qu'il est d'autant plus important que la charge est légère. D'autre part, lors de la contraction d, on observe un raccourcissement du sarcomère alors que le muscle demeure "isométrique". Le raccourcissement du sarcomère lors de la contraction d est lié à l'étirement d'éléments élastiques très compliants siégeant en grande partie au niveau des extrémités du muscle fixé dans les clips (KRUEGER et POLLACK, 1975). D'autre part, cette figure montre que la vitesse instantanée de raccourcissement du sarcomère dépend aussi de la charge et qu'elle est d'autant plus

élevée que la charge est faible. Surtout, le raccourcissement du sarcomère survient immédiatement après le temps de latence post-stimulation. Il n'y a pas au niveau de SL de phases purement isométrique ou isotonique comme on l'observe au niveau du raccourcissement du muscle entier (ML). Le comportement du sarcomère est auxotonique*. De plus, il existe au début de la phase de raccourcissement des sarcomères une voie commune. La durée de cette voie commune est d'autant plus brève que la charge totale est plus faible. Pour un niveau donné de charge totale, la fin de la voie commune du raccourcissement du sarcomère correspond à la transition entre les phases isométrique et isotonique. La partie droite de la Figure 8 représente les diagrammes en plan de phase SV-SL et MV-ML dont nous verrons tout l'intérêt sur la Figure 9.

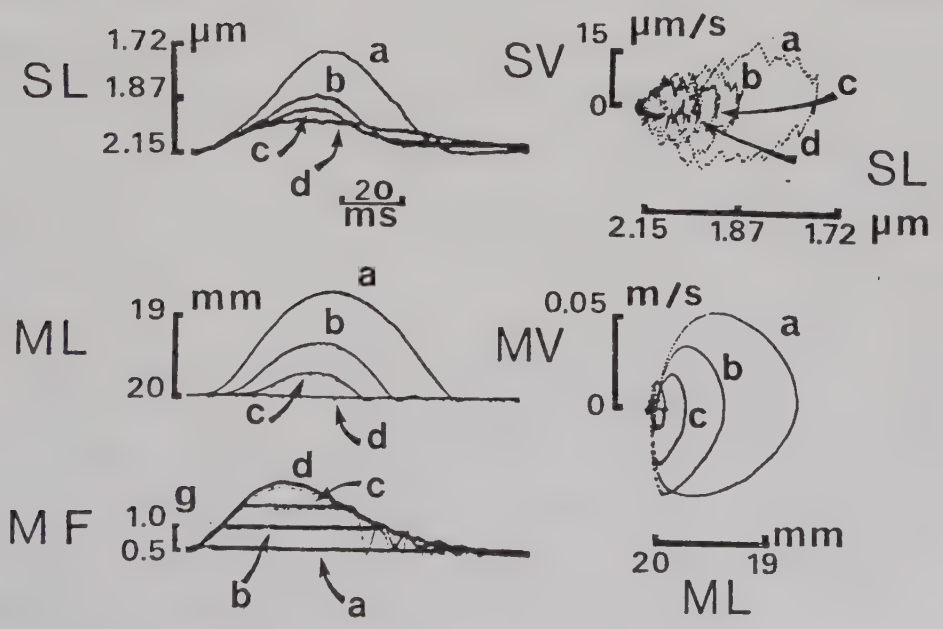



FIG.8

* du gr : auxê : croissance.

b - Relation bijective* SV-SL.

La possibilité de modifier brusquement la charge au cours de la contraction permet d'obtenir, d'un point de vue mécanique, des résultats importants. Cette technique a été introduite par D. L. BRUTSAERT et est à la base du concept qui a conduit à l'élaboration de la relation tridimensionnelle Force-Vitesse-Raccourcissement caractérisant le niveau de contractilité du muscle cardiaque. D. L. BRUTSAERT a réalisé sur le muscle cardiaque, l'expérience fondamentale que nous reproduisons sur le muscle squelettique à la partie inférieure de la Figure 9. De plus, nous montrons à la partie supérieure de cette figure le comportement du sarcomère.

La Figure 9 montre trois contractions : a, b, c. La contraction a se déroule avec une charge totale égale à la précharge (0,5 g) ; la contraction b supporte une charge totale égale à 1 g ; la contraction c se déroule au début dans des conditions de charge identiques à celles de la contraction b, mais est rapidement ramenée aux conditions de charge de la contraction a après une brusque modification de charge (load clamp). Lorsqu'on examine le plan de phase MV-ML, on observe que les traces des contractions a et c deviennent rapidement superposées après la modification de charge. Par contre, les traces ML des contractions a et c en fonction du temps sont dissociées. Donc pendant une période déterminée de la phase de contraction, et, pour un niveau de charge donné, la vitesse de raccourcissement du muscle s'adapte instantanément au raccourcissement du muscle, indépendamment des conditions de charge avant le "load clamp". Lors des contractions a et c, un degré donné de raccourcissement est atteint à des instants différents. Donc, durant une phase déterminée de la contraction, la

* *Il existe une correspondance biunivoque ou une fonction bijective entre un ensemble E et un ensemble F si à tout élément de F correspond un et un seul élément de l'ensemble E.*

vitesse de raccourcissement est une fonction biunivoque (ou bijective) du raccourcissement, "indépendamment du temps". Cette propriété fondamentale, montrée par D. L. BRUTSAERT au niveau du muscle cardiaque s'avère vérifiée au niveau du muscle squelettique. Il s'agit donc d'une propriété mécanique commune aux muscles striés cardiaque et squelettique. Cela est inhérent à leur structure sarcomérique comme le montre l'enregistrement du raccourcissement du sarcomère au cours des contractions a, b et c de la Figure 9. On observe en effet au niveau du sarcomère un comportement analogue à celui du muscle entier. Après le changement de charge, la trace c vient rapidement se confondre avec la trace a sur le plan de phase SV-SL, alors que les traces de ces deux contractions en fonction du temps sont dissociées. Pour un niveau déterminé de la charge totale finale, l'adaptation instantanée de la vitesse de raccourcissement des sarcomères à leur raccourcissement se fait indépendamment de l'amplitude de la variation de charge, et de l'instant auquel est imposée cette variation de charge. Il ne faut cependant pas que la variation de charge soit trop importante ou imposée trop tardivement dans la phase de contraction. Ainsi, nous parvenons au résultat suivant : la vitesse de raccourcissement du sarcomère est une fonction bijective du raccourcissement du sarcomère durant une partie déterminée de la phase de contraction isotonique du muscle.

Les termes "fonction biunivoque ou bijective" explicitent le fait qu'à une valeur déterminée de la vitesse de raccourcissement correspond une et une seule valeur du raccourcissement.

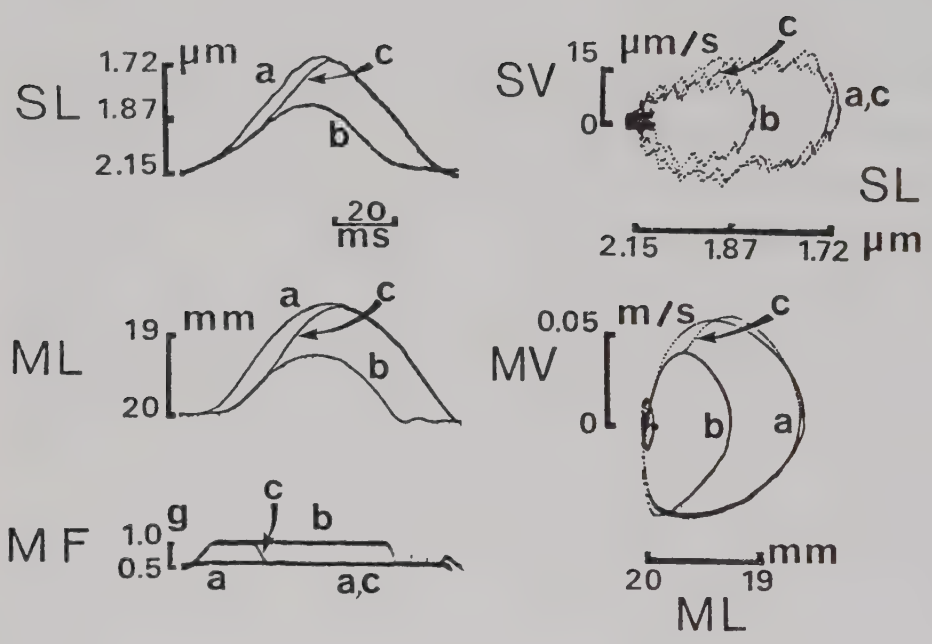



FIG.9

L'unité histologique et mécanique élémentaire, fondement de cette propriété, est donc le sarcomère. Le fait d'observer cette propriété simultanément au niveau du sarcomère et à celui du muscle entier suggère que l'ensemble des sarcomères assurant la contraction du muscle se raccourcissent de façon hautement synchrone. La relative finesse des franges de diffraction et le fait qu' elles ne s'élargissent pas de façon très importante lors de la phase de contraction renforcent cette hypothèse.

c - Mesure de la vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères.

La mesure de la vitesse maximale de raccourcissement du muscle (Vmax) a évolué au cours de la dernière décennie. La mesure de Vmax initialement se faisait à partir du diagramme Vitesse-Force en extrapolant à charge nulle la courbe des pics de vitesse de raccourcissement en fonction de la charge totale. Cette méthodologie posait divers problèmes théoriques qui ont été solutionnés par la mise au point d'une autre technique introduite par D. L. BRUTSAERT (1971b). Celle-ci consiste à délester totalement le muscle de sa charge, immédiatement après la stimulation. Cette technique dite du "zéro-load-clamp" offre un double avantage :
(i) elle ne dépend plus du modèle mathématique choisi pour extrapoler à charge nulle dans l'autre technique.
(ii) Elle donne une valeur de la vitesse maximale de raccourcissement qui est un point à part entière de la relation F-V-L et qui de plus la caractérise entièrement. En effet, à une valeur de Vmax calculée par la technique du "zéro-load-clamp" correspond une et une seule relation tridimensionnelle F-V-L.

La technique du "zéro-load-clamp" peut être appliquée à la mesure de la vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères à charge nulle. Nous illustrerons cela au paragraphe I-C.2 dans l'étude de la Vmax des sarcomères myocardiques.

d - Effets de la variation d'inotropie sur la cinétique de raccourcissement des sarcomères.

Contrairement au tissu cardiaque l'inotropie du muscle squelettique est insensible à une modification de la concentration extracellulaire de calcium. On peut modifier

le niveau inotrope du muscle squelettique en changeant la fréquence de stimulation. Cela s'observe dans le muscle cardiaque de mammifère, où chaque espèce a une fréquence de stimulation optimale déterminant une réponse mécanique maximale. Il est possible d'induire dans le muscle squelettique une variation d'inotropie en changeant l'intensité de la stimulation. A l'inverse, dans le tissu cardiaque existe un seuil du champ électrique de stimulation fonctionnant en tout ou rien, au-dessous duquel il n'y a aucune réponse mécanique. Ces procédés susceptibles d'induire un changement d'inotropie ne modifient pas le nombre de fibres concernées dans la réponse mécanique car la largeur des franges de diffraction est indépendante de l'intensité du champ électrique de stimulation pour un degré de raccourcissement donné des sarcomères. Si la variation d'inotropie était due à une variation du nombre de fibres recrutées, le coefficient de dispersion varierait, ce qui n'est pas observé (KAWAI et KUNTZ, 1973). La réponse mécanique du muscle est liée à l'état inotrope de chacune des fibres squelettiques individuelles et est fonction de l'intensité du champ électrique de stimulation.

La figure 10 présente quatre contractions a, b, c et d. Les contractions a et b sont effectuées avec seulement la précharge ; les contractions c et d sont effectuées en mode "isométrique". Les contractions b et d surviennent après une modification d'inotropie du muscle, par rapport aux contractions contrôles respectives a et c. Après effet inotrope positif, l'amplitude maximale de raccourcissement et la vitesse de raccourcissement des sarcomères augmentent. Ces résultats sont vérifiés, que la contraction de référence soit la contraction préchargée, ou bien la contraction "isométrique". Lors de la contraction "isométrique" d, la force maximale développée par le muscle et l'am-

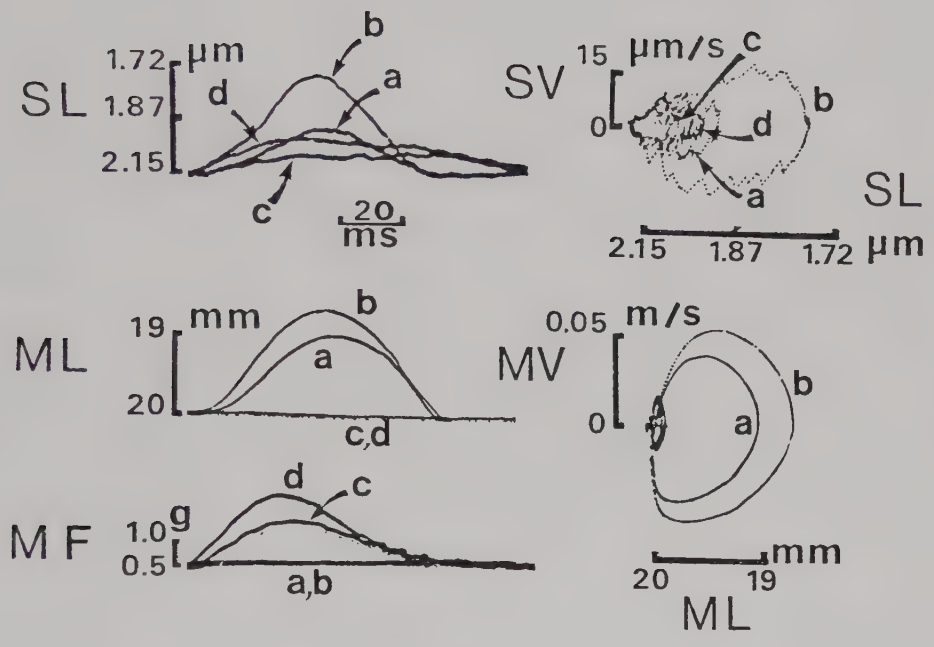



FIG.10

plitude maximale de raccourcissement des sarcomères sont supérieures à celles observées lors de la contraction "isométrique" c. Donc <u>après un effet inotrope positif, le nouveau pic de tension isométrique du muscle est atteint à une valeur différente d'amplitude maximale de raccourcissement des sarcomères, par rapport à la contraction contrôle</u>. Ce phénomène doit être pris en compte, en particulier lorsqu'on étudie l'influence de la longueur du

muscle sur l'activation (note 1).

Pour un niveau donné de la charge totale, un pourcentage déterminé de raccourcissement des sarcomères est atteint d'autant plus tôt et avec une vitesse d'autant plus grande que le niveau inotrope est plus élevé (Figure 10) ; dans tout nouvel état inotrope, la vitesse de raccourcissement des sarcomères reste fonction biunivoque du raccourcissement des sarcomères. Il n'y a actuellement pas de méthode permettant de calculer la force instantanée générée par un sarcomère durant son raccourcissement auxotonique. Il n'est donc pas possible de construire le diagramme tridimensionnel Force-Vitesse-Raccourcissement du sarcomère. La relation entre la charge du muscle et la somme des forces élémentaires générées par chacun des sarcomères n'est pas connue. On peut, au mieux pour l'instant, construire un diagramme tridimensionnel Vitesse-Raccourcissement du sarcomère en fonction de la charge isotonique du muscle (diagramme SV-SL-MF). Si l'on fait varier la charge isotonique du muscle, l'ensemble des relations biunivoques vitesse-raccourcissement des sarcomères indépendantes du temps forment un continuum. Ce continuum tridimensionnel caractérise le niveau de contractilité du muscle squelettique. Toute variation de contractilité déplace ce continuum dans l'espace tridimensionnel SV-SL-MF.

---

Note 1 : En effet deux types de facteurs pourraient représenter des déterminants essentiels de la force développée par le muscle : (i) des facteurs biochimiques dans lesquels l'activation pourrait elle-même être modulée par la longueur des fibres ; (ii) des facteurs morphologiques dominés par le degré de chevauchement des filaments fins et épais (Revue générale JEWELL, 1977). Lors d'effets inotropes il apparait donc nécessaire de comparer les réponses mécaniques du muscle lorsque les sarcomères présentent un même degré de raccourcissement, et donc un même degré de chevauchement des filaments fins et épais.

2 - Sur le muscle cardiaque :

Les franges de diffraction obtenues à partir du muscle cardiaque sont généralement moins nettes, moins brillantes et plus larges que celles obtenues à partir du muscle squelettique. Cela est lié à un certain degré de dispersion (i) de la direction des fibres myocardiques, (ii) de la longueur des sarcomères dans le tissu cardiaque. Toutefois, les franges de diffraction ont été suffisamment nettes, fines et brillantes dans dix trabécules de ventricule droit de rat pour permettre une analyse quantitative de la performance mécanique des sarcomères myocardiques. Trois trabécules, bien que présentant un spectre de diffraction net ont un rapport tension de repos sur tension totale supérieur à 20 % et ne sont pas inclus dans les calculs des divers indices de contractilité.

a - Caractéristiques mécaniques des trabécules au repos ($\pm$ SEM).

. Longueur: 2,6 $\pm$ 0,2 mm.

. Section elliptique : 0,052 $\pm$ 0,008 $mm^2$.

. Tension de repos à Lmax : 0,9 $\pm$ 0,1 mN

. Tension de repos normalisée par rapport à la section : 16,4 $\pm$ 1,4 $mN/mm^2$.

. Rapport tension de repos/tension totale à Lmax : 17 $\pm$ 2 %

. Longueur des sarcomères au repos (SLo) à Lmax : 2,20 $\pm$ 0,02 µm.

. Largeur des trabécules : 389 $\pm$ 34 µm.

. Epaisseur des trabécules : 167 $\pm$ 15 µm.

b - Caractéristiques mécaniques des trabécules lors de la contraction "isométrique" à Lmax.

. Tension totale : 5,4 ± 0,8 mN

. Tension totale/$mm^2$ : 105 ± 6 $mN/mm^2$

c - Raccourcissement des sarcomères.

Au cours de la contraction avec précharge seule et au cours de la contraction "isométrique".

| | Contraction avec précharge seule | Contraction "isométrique" |
|---|---|---|
| Longueur des sarcomères au pic de raccourcissement (µm) | 1,90 ± 0,02 | 2,04 ± 0,02 |
| Amplitude maximale de raccourcissement des sarcomères (µm) | 0,30 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 |
| Pourcentage maximum de raccourcissement des sarcomères (%) | 13,6 ± 0,4 | 7,0 ± 0,5 |

d - Raccourcissement des sarcomères en fonction du temps, à divers niveaux de charge totale.

La Figure 11 montre quatre contractions a, b, c et d où l'on a imposé au muscle une charge progressivement croissante. Lors de la contraction a, le muscle est uniquement préchargé à Lmax. Lors des contractions b et c, une postcharge croissante est surajoutée à la précharge. Lors de la contraction d, le muscle se contracte isométriquement. L'amplitude maximale de raccourcissement et

la vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères sont d'autant plus importantes que la charge est plus faible. A un instant donné de la phase de raccourcissement, l'amplitude de raccourcissement et la vitesse instantanée de raccourcissement des sarcomères sont d'autant plus grandes que la charge est plus faible. Le temps au bout duquel le maximum de raccourcissement est atteint survient d'autant plus tardivement que la charge est plus lourde.

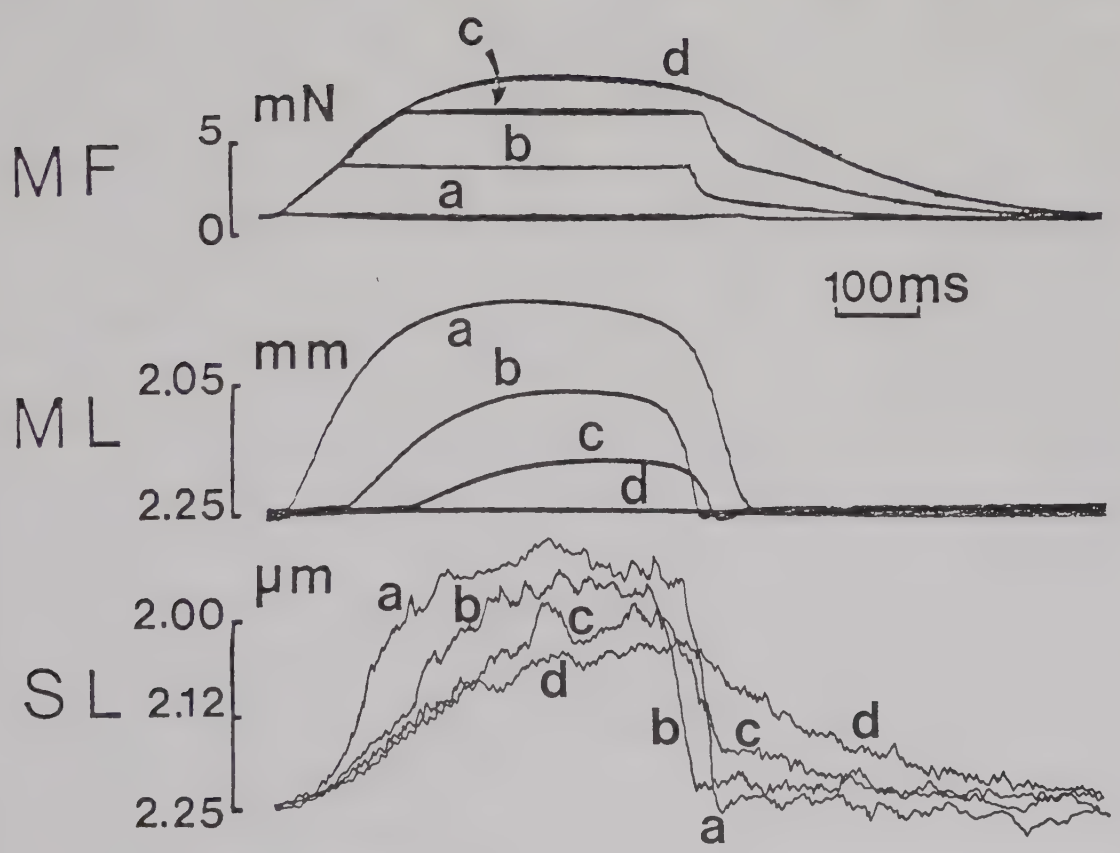



FIG.11

e - La relation pic de vitesse des sarcomères - force du muscle (SV-MF).

La Figure 12 montre la courbe du maximum de vitesse de raccourcissement des sarcomères en fonction de la charge isotonique imposée au muscle. La décroissance de la courbe au fur et à mesure que la charge augmente rappelle l'aspect hyperbolique classique de la relation force-vitesse décrite au niveau du muscle entier. La valeur moyenne du maximum de vitesse des sarcomères est de 2,09 ± 0,11 µm/s au cours de la contraction avec précharge seule et de 0,84 ± 0,11 µm/s au cours de la contraction isométrique. Les valeurs des vitesses pour des charges intermédiaires comprises entre la précharge et la charge isométrique sont indiquées sur la Figure 5 de l'article "Real time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction".

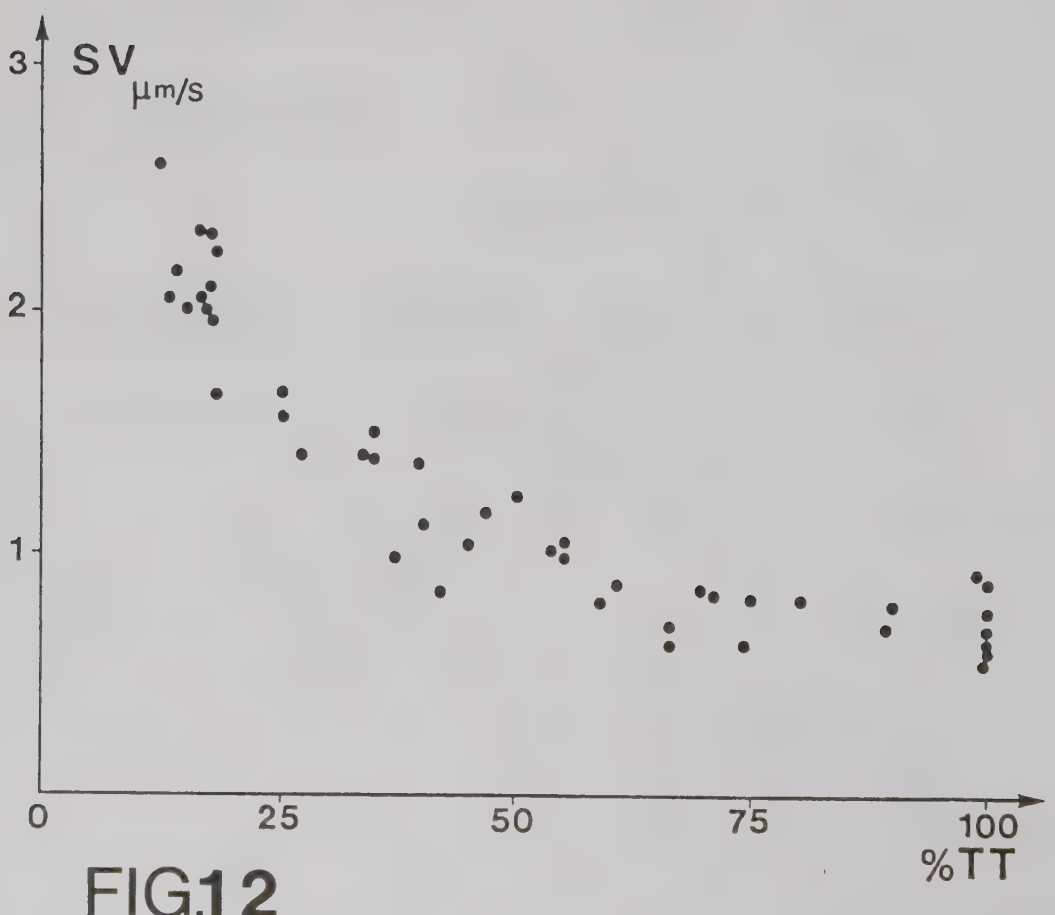



FIG.12

Nous avons effectué un ajustement exponentiel entre la vitesse maximale du sarcomère (SVmax) et la charge isotonique (MF) aboutissant à la fonction suivante :

$\boxed{SVmax = 2,2 \exp (-1,4.10^{-2} MF)}$ avec un coefficient de régression r = 0,97.

f - Vitesse maximale du sarcomère à charge nulle par la méthode du "zéro-load-clamp".

Le principe et les avantages de la méthode ont été décrits au paragraphe I-C.1. Sur la Figure 13 sont représentées deux contractions : la contraction a préchargée à Lmax et la contraction b préchargée aussi à Lmax, mais dont la charge est supprimée juste après la stimulation. Il est nécessaire d'imposer un "damping" critique pour atténuer de façon adéquate les oscillations observées au niveau de la trace du raccourcissement du muscle en fonction du temps (D. L. BRUTSAERT, 1971 b). Ces oscillations sont dues aux éléments élastiques en série localisés en grande partie aux extrémités de la préparation altérée au niveau des clips (KRUEGER et POLLACK, 1975).

On n'observe pas ces oscillations au niveau du sarcomère. Ceci corrobore l'idée que la localisation des éléments visco-élastiques responsables des oscillations se situe en série des sarcomères. La vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères à charge nulle du muscle présenté sur la Figure 13 est le double de la valeur du pic de vitesse de la contraction avec précharge seule.

Cette technique permet donc une mesure très précise de la vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères à charge nulle, d'autant que la valeur de la longueur

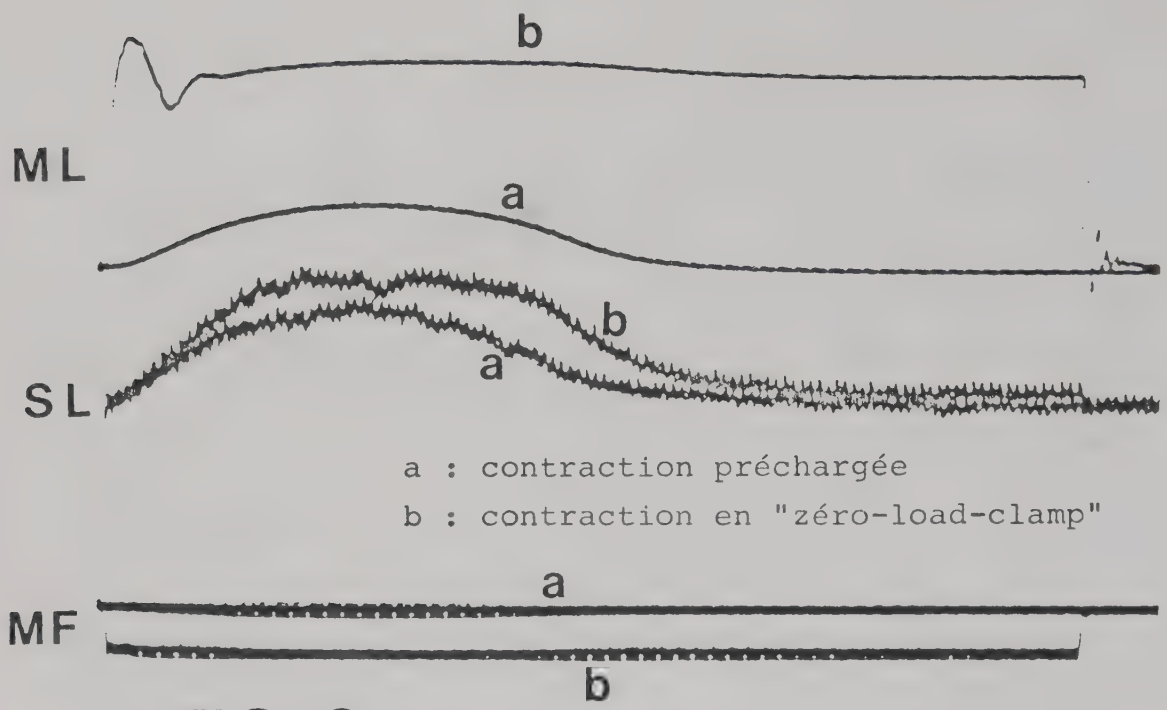



FIG.13

instantanée des sarcomères est appréciée avec une précision de 200 Å. L'imprécision autour de la mesure de la Vmax du muscle entier est plus grande du fait que l'on ne connait pas l'importance des zones mortifiées par les clips et donc non contractiles (cette imprécision varie d'un muscle à l'autre et est d'autant plus importante que le muscle est petit).

g - Effets inotropes au niveau des sarcomères et du muscle entier.

Nous avons effectué des modifications inotropes négatives en adjoignant à la solution physiologique du Vérapamil ($10^{-7}$ M). On obtient rapidement une baisse importante de la performance contractile du muscle. La Figure 14 met en évidence l'effet dépresseur du Vérapamil lors d'une contraction postchargée b, par rapport à la contraction contrôle a supportant la même postcharge. Après Vérapamil la durée de la phase de contraction isométrique précédant le plateau isotonique est plus longue et la vitesse de mise en tension est plus faible. A tout instant t de la phase de raccourcissement des sarcomères,

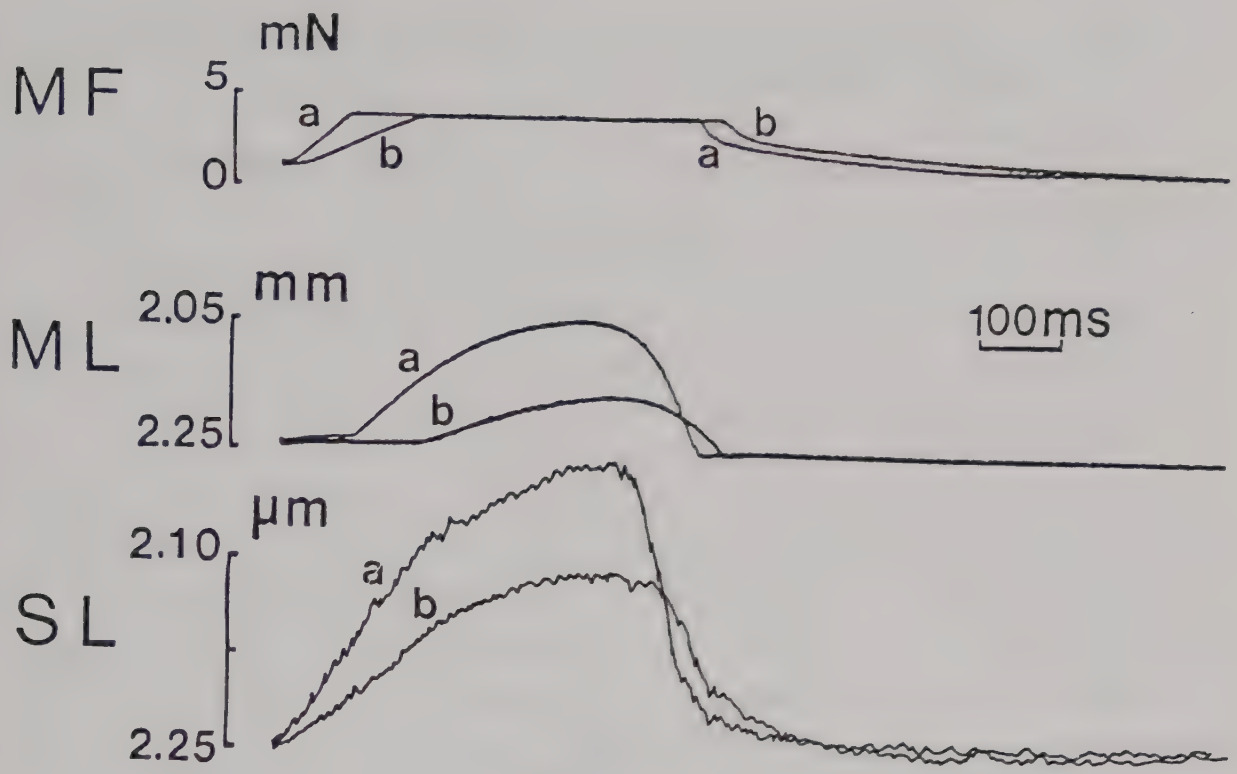



FIG.14

la vitesse de raccourcissement SV et l'amplitude de raccourcissement SL sont plus faibles après cet effet inotrope négatif. Le plateau isotonique est atteint avec la même longueur de sarcomère dans les deux contractions a et b. Durant la phase "isométrique" (Fig. 14) un niveau déterminé de force est atteint avec la même longueur de sarcomère. Cet effet inotrope négatif provoque un retardement synchronisé de la mise en tension isométrique et de raccourcissement des sarcomères.

## I-D. LA RELATION BIUNIVOQUE VITESSE-RACCOURCISSEMENT : MODELE THEORIQUE

Nous avons étudié avec M. DUVELLEROY un modèle biophysique théorique rendant compte du fait qu'il existait pour un niveau de charge donné, une relation biunivoque entre la vitesse de raccourcissement des sarcomères et leur raccourcissement indépendant du temps. Cela impose de décomposer artificiellement le muscle papillaire en éléments actifs générateurs de force et passifs visco-élastiques. Cette décomposition ne correspond pas à une entité ultrastructurale simple, car la situation exacte et le type des éléments visco-élastiques inclus dans le tissu myocardique sont particulièrement complexes à déterminer avec précision. Les hypothèses émises dans les équations concernant le système contractile sont applicables indépendamment de la disposition des éléments élastiques (systèmes type Maxwell, type Voigt ou autre). Nous avons choisi un système type Kelvin schématisé sur la Figure A comportant des éléments contractiles (CE), somme de l'ensemble des sarcomères, des éléments visqueux (VE) et élastiques (PE) disposés en parallèle des éléments contractiles et des éléments élastiques (SE) en série des éléments contractiles. La mise en équation du système a été effectuée par J. DROULEZ.

### 1 - Equation de la force engendrée par les éléments contractiles :

La force engendrée par les éléments contractiles CE dépend d'au moins deux variables : la longueur des sarcomères et le temps. Nous avons vu que la force isométrique du muscle dépendait de la longueur des sarcomères et par conséquent du degré de chevauchement des filaments fins et épais (A. GORDON et coll, 1966 et Figure 1). La

forme de la partie ascendante de la relation isométrique force-longueur nous a conduit à choisir une relation F(z) entre la force des sarcomères et leur longueur, de type parabolique

$$F(z) = - Fo\ (z - l_1)\ (z + l_2)$$

Fo, $l_1$ et $l_2$ étant les coefficients de la parabole.

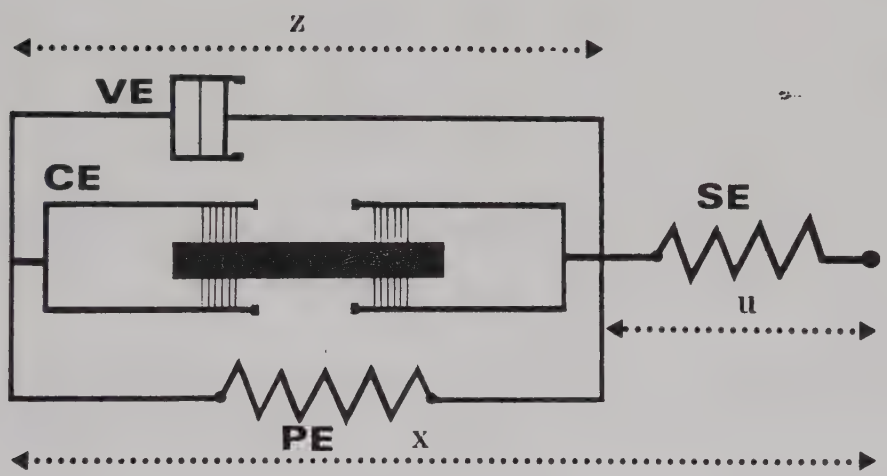



FIG.A

D'autre part, il a été montré que l'activation atteignait son maximum rapidement après la stimulation du muscle (D. L. BRUTSAERT, 1974 b). La vitesse maximale du muscle à charge nulle survient à environ 15 % de la valeur du temps mesurée au maximum de tension isométrique. L'ascension rapide de l'activation Y(t) en fonction du temps est représentée par la fonction exponentielle complémentaire

$$Y\ (t) = 1 - e^{-kt}$$

Soit $t_o$ l'instant où l'activation com-

mence à diminuer, on a alors :

$$Y(t) = (1 - e^{-kto})\, e^{-k(t - to)} \quad ; \quad (t > to)$$

(k étant l'inverse de la constante de temps ; $1/k \simeq 5$ ms)

A l'instant t de la contraction, la force générée par l'ensemble des éléments contractiles est

$$CE(z,t) = F(z).Y(t).$$

2 - Equations des forces dues aux éléments visco-élastiques :

a - Les éléments élastiques passifs sont classiquement de type exponentiel. La force exercée par les éléments élastiques SE en série est

$$S(u) = s\,(e^{\beta u} - 1)$$

La force exercée par les éléments élastiques en parallèle des éléments contractiles est

$$P(z) = p\,(e^{\alpha z} - 1)$$

u et z étant respectivement les longueurs de SE et PE, $\alpha$, $\beta$, s et p étant les paramètres d'élasticité.

b - Il est nécessaire d'ajouter des éléments visqueux VE en parallèle des éléments contractiles afin de limiter la vitesse de raccourcissement de ceux-ci. D'autre par, si ces éléments visqueux se situaient en parallèle avec le muscle entier (CE + SE), ils ne pourraient pas limiter la vitesse de raccourcissement de CE lors de la contraction "isométrique" ; s'ils étaient situés en parallèle avec SE, ils ne pourraient pas limiter la vitesse de raccourcissement du muscle lors de contractions isotoniques. Les éléments visqueux VE se situent donc en parallèle avec les éléments contractiles CE (Figure A). VE génèrent une force résistante de type fluide, propor-

tionnelle à la vitesse de raccourcissement $\dot{z}$ des éléments contractiles dont l'équation est

$$VE\ (\dot{z}) = - D \frac{dz}{dt}$$

où D est le coefficient de viscosité.

3 - Equation générale du système :

L'équation générale caractérisant le système est donnée par la somme des forces en présence en tenant compte de leur direction respective, et qui est égale à zéro lorsque le système opère, soit

$$CE\ (z,t) + VE\ (\dot{z}) + P\ (z) - S\ (u) = 0$$

Cette équation différentielle non linéaire du premier ordre a été résolue sur calculateur analogique EAI, type Mini Ac.

Les coefficients des équations ont été déterminés par identification des courbes théoriques aux courbes expérimentales obtenues sur le muscle papillaire de rat normal :

$\alpha = \beta = 2,64\ mm^{-1}$
$s = p = 0,12\ g.f$
$D = 3,41\ kg/s$
$l_1 = 1,11\ mm$
$l_2 = 0,57\ mm$
$Fo = 0,85\ g/mm^2$

4 - Résultats :

- La relation biunivoque entre la vitesse et le raccourcissement des éléments contractiles.

La Figure B représente le raccourcissement et la vitesse de raccourcissement des éléments contractiles (CE) en fonction du temps et le plan de phase vitesse-raccourcissement, durant trois contractions post-char-

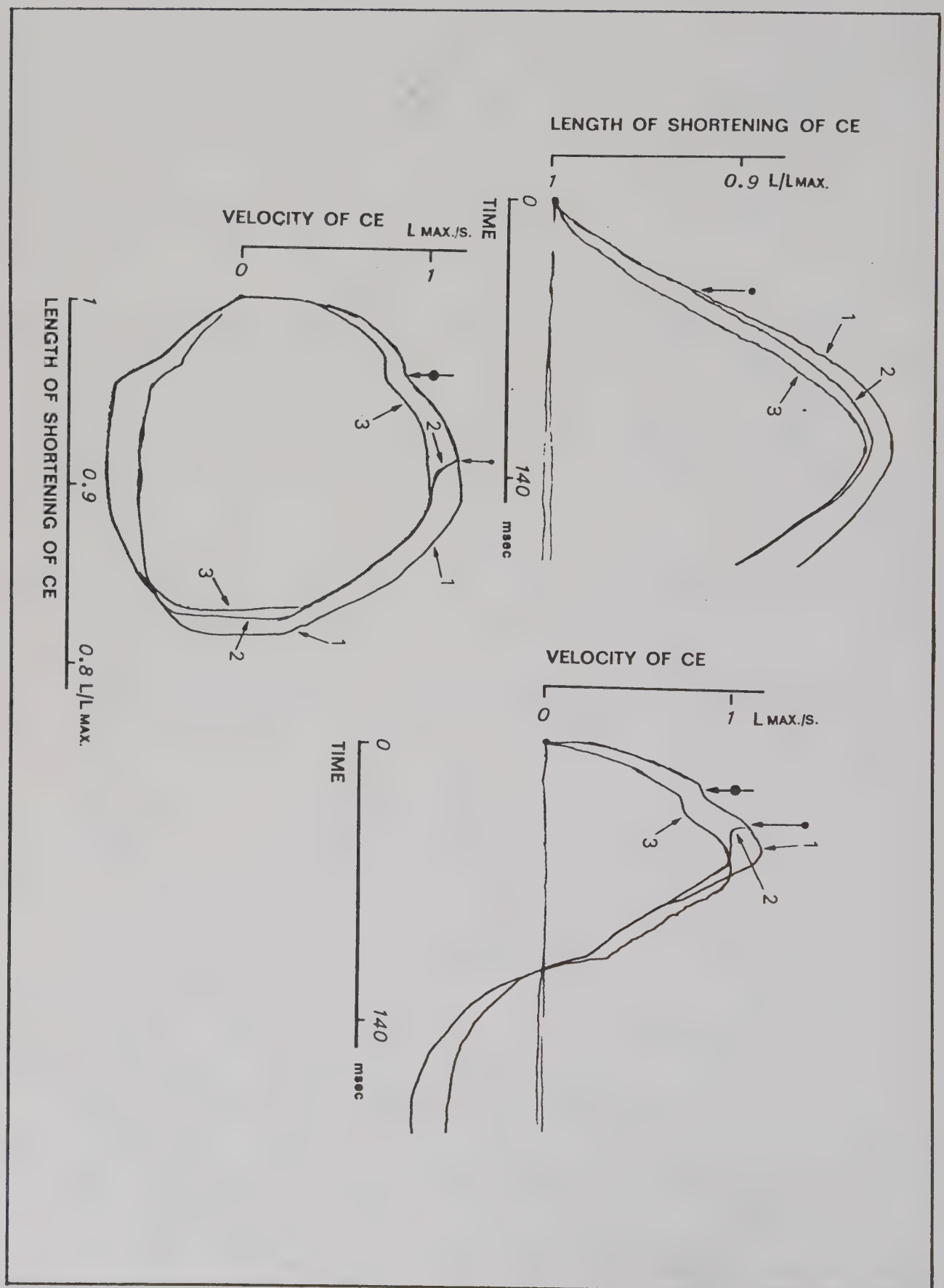
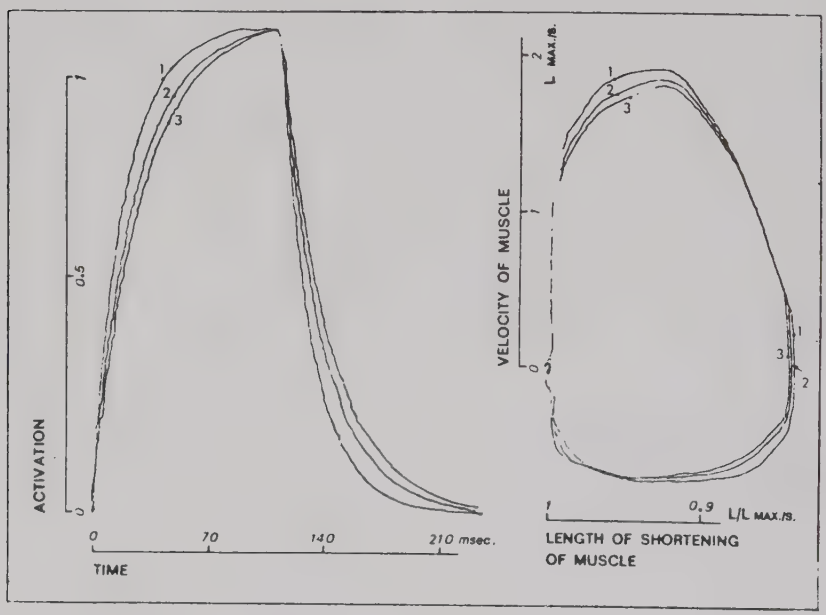

LENGTH OF SHORTENING OF CE
1
0.9 L/LMAX.
VELOCITY OF CE
L MAX./S.
0
1
TIME
0
140
msec
1
LENGTH OF SHORTENING OF CE
0.9
0.8 L/L MAX.
VELOCITY OF CE
0
1 L MAX./S.
TIME
0
140
msec
1
2
3

FIG.B

gées. La contraction 2 commence dans les mêmes conditions que la contraction 1 ; une charge supplémentaire lui est imposée ($\dot{\ell}$) au cours de sa phase de raccourcissement, de sorte qu'elle soit alors chargée similairement à la contraction 3. Rapidement après la brusque variation de charge, les traces des deux contractions 2 et 3 sont superposées sur le plan de phase vitesse-raccourcissement, alors qu'elles sont distinctes sur le diagramme du raccourcissement en fonction du temps. Ce phénomène est strictement identique à celui observé sur le muscle strié vivant et présenté sur la Figure 9. Ainsi, pour un niveau donné de la charge isotonique du muscle, la vitesse de raccourcissement des éléments contractiles (CE) est une fonction biunivoque de leur raccourcissement, indépendamment du temps.

On peut montrer, à partir de l'équation générale du système, que durant le trajet commun vitesse-raccourcissement observé sur le plan de phase, une valeur donnée de vitesse de raccourcissement de CE n'est atteinte que pour un et un seul niveau d'activation possible. Comme il existe une relation bijective entre vitesse et raccourcissement, et qu'un degré donné de raccourcissement est atteint à des instants différents (contractions 2 et 3 Fig. B), cela impose que le niveau d'activation soit le même durant la phase où l'on observe cette relation bijective. Cela est illustré sur la Figure C (haut) où l'on a changé la constante de temps de la fonction d'activation Y (t) sans modifier le niveau final d'activation. La voie commune sur le plan de phase vitesse-raccourcissement du muscle persiste mais son début dépend de la constante de temps de la fonction d'activation. D'autre part, si pour un niveau fixe de

la charge totale l'on modifie le niveau final de la fonction d'activation Y (t), le plan de phase vitesse-raccourcissement se modifie (Figure C, bas). Cela correspond à une variation d'inotropie. La voie commune vitesse-raccourcissement du CE indépendante du temps correspond à la partie du cycle où l'activation ne varie presque plus et peut être considérée comme en plateau.



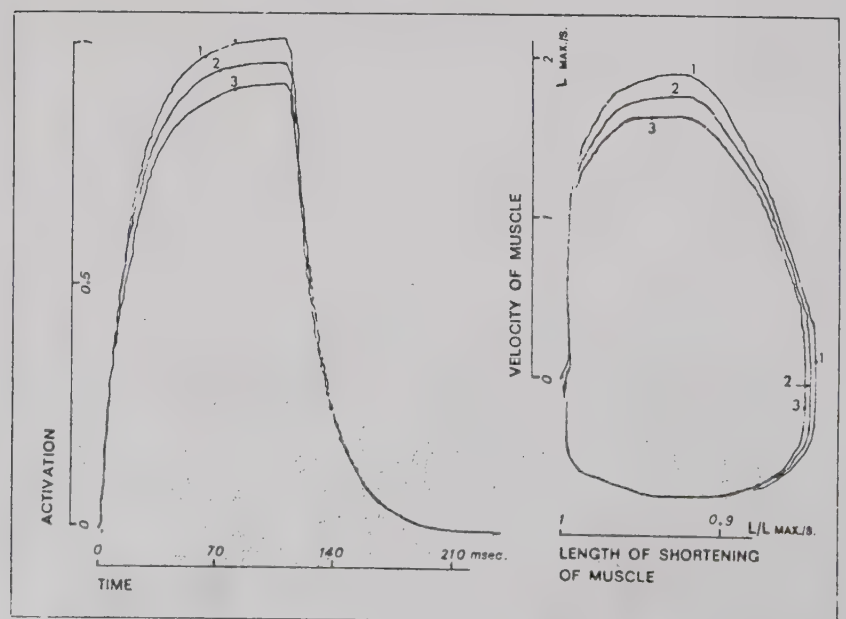




FIG.C

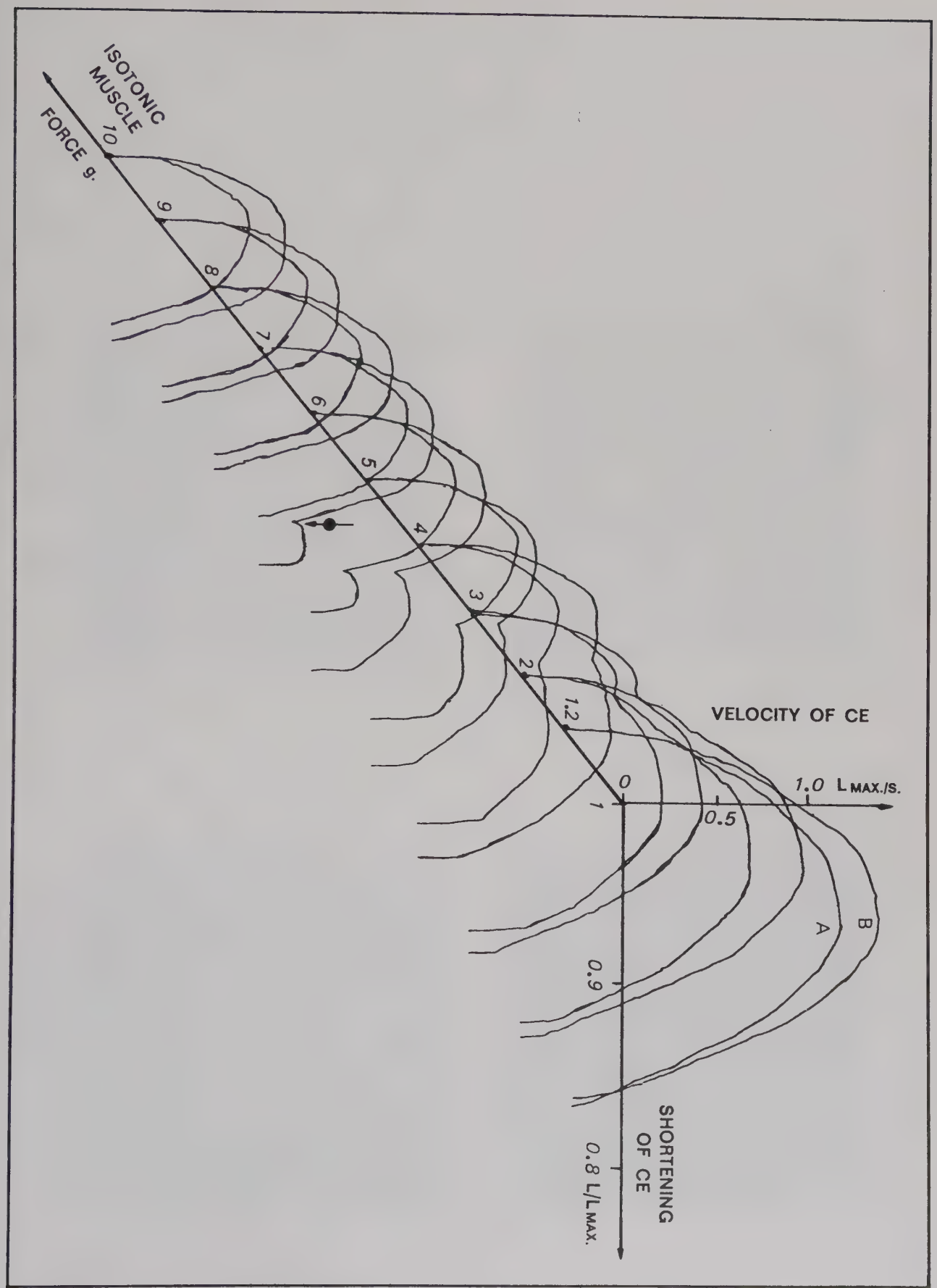

ISOTONIC MUSCLE FORCE
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1.2
1
0
VELOCITY OF CE
1.0 L MAX./S.
0.5
0.9
0.8 L/L MAX.
SHORTENING OF CE
A
B

FIG.D

D. L. BRUTSAERT (1974b) a interprété l'indépendance du temps de la fonction biunivoque vitesse-raccourcissement par un "équilibre" de l'activation (les mécanismes contribuant à l'activation étant équilibrés par les mécanismes responsables de l'inactivation). Nous verrons l'intérêt de cette interprétation dans le chapitre III où seront étudiées les relations force-vitesse-raccourcissement lors de l'hypertrophie cardiaque.

Enfin, le diagramme tridimensionnel vitesse-raccourcissement des éléments contractiles en fonction de la charge du muscle est représenté sur la Figure D avant et après un effet inotrope. On voit sur ce diagramme que l'amplitude maximale de raccourcissement et le pic de vitesse des éléments contractiles diminuent lorsque la charge augmente ou lorsqu'on effectue un effet inotrope négatif. Nous avons observé des résultats analogues au niveau des sarcomères de muscles squelettique et cardiaque étudiés par diffraction laser (voir Figures 8, 10, 11, 12 et 14).

La Figure E montre le raccourcissement, la vitesse de raccourcissement et la force des éléments contractiles en fonction du temps, lors de deux contractions à longueur initiale différente ($L_{max}$ et - 2,5 % de $L_{max}$) et à charge totale identique. On constate que sur les deux diagrammes vitesse-raccourcissement et force-raccourcissement des éléments contractiles il existe une voie commune indépendante du temps et de la longueur initiale. Surtout, le maximum de force développé par les éléments contractiles survient bien avant leur pic de raccourcissement. Cela est lié aux éléments visqueux en parallèle des éléments contractiles dont l'influence est d'autant plus importante

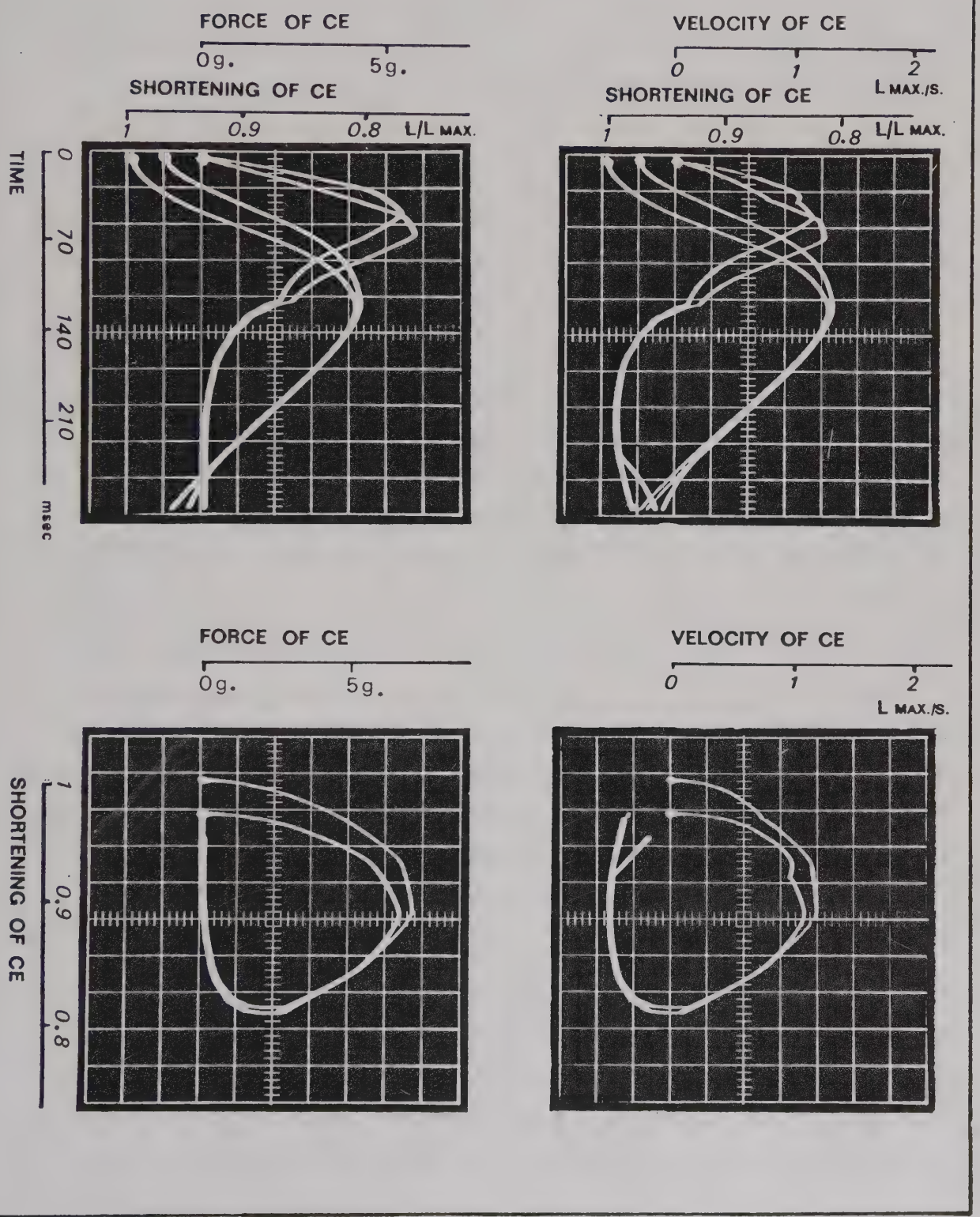

FORCE OF CE
0g.
5g.
SHORTENING OF CE
1
0.9
0.8
L/L MAX.
TIME
0
70
140
210
msec
VELOCITY OF CE
0
1
2
L MAX./S.
SHORTENING OF CE
1
0.9
0.8
L/L MAX.
FORCE OF CE
0g.
5g.
SHORTENING OF CE
1
0.9
0.8
VELOCITY OF CE
0
1
2
L MAX./S.

FIG.E

que la vitesse est grande.

Ces faits montrent la nécessité de connaître à chaque instant la situation, la longueur et la vitesse des éléments visqueux et élastiques dont l'influence n'est pas négligeable, ce qui est possible sur un modèle théorique mais illusoire sur le tissu myocardique vivant. Une meilleure connaissance des étapes complexes du couplage excitation-contraction mais aussi de la nature même du tissu musculaire strié permettra par exemple de mieux comprendre pourquoi le pic de luminescence de l'aequorine (protéïne bioluminescente en présence de calcium) survient bien avant le pic de tension isométrique du muscle.

En résumé, ce modèle théorique rend compte des résultats expérimentaux observés dans le tissu musculaire strié. En particulier on retrouve la relation tridimensionnelle F-V-L du muscle, indépendante du temps, décrite par D. L. BRUTSAERT, et caractérisant le niveau de contractilité myocardique. La relation bijective entre vitesse et raccourcissement du sarcomère (Fig. 9) est observée au niveau des éléments contractiles de ce modèle théorique (Fig. D). Enfin celui-ci rend compte du fait que la vitesse maximale de raccourcissement du muscle à charge nulle soit indépendante de la longueur initiale pour des longueurs initiales comprises entre $L_{max}$ et -10 % de $L_{max}$.

## CHAPITRE II

## LA RELAXATION.

### A - INTRODUCTION

Le champ de connaissances sur la relaxation cardiaque s'est largement ouvert ces dernières années depuis la publication des travaux de D. L. BRUTSAERT (1978 a et b) concernant les rapports entre la charge et le comportement mécanique du muscle durant le retour à sa position de repos. De nombreux mécanismes intracellulaires se déroulent tantôt simultanément, tantôt successivement, et nous connaissons encore imparfaitement dans quelle mesure tel évènement peut influer sur tel autre parmi tous ceux qui concourent à la relaxation du muscle cardiaque. Il ressort cependant qu'un double mécanisme contrôle la relaxation du coeur de mammifère. Celle-ci est régulée d'une part par la charge imposée au muscle et cela à partir du dernier tiers de la phase de contraction, d'autre part par les processus intracellulaires d'inactivation. La prédominance de l'un ou l'autre de ces deux mécanismes est fonction de la classe de vertébré considérée (mammifère ou batracien). Au sein d'une même classe elle dépend de l'ordre considéré (carnivore : chat ; rongeur : rat, lapin ; ongulés : porc, etc...). Au sein d'une même espèce, elle dépend de l'âge, de la fréquence de stimulation, des conditions expérimentales (température, concentration externe de calcium, etc...). Le réticulum sarcoplasmique intervient manifestement au niveau du premier

mécanisme de régulation. Des expériences de physiologie comparée chez le mammifère et chez la grenouille effectuées à l'origine par D. L. BRUTSAERT (1978 a) apportent les premiers arguments. En effet, les mammifères adultes possèdent un réticulum sarcoplasmique développé, contrairement au myocarde de grenouille (N. A. STALEY et E. S. BENSON, 1968). La Figure 15 montre que la relaxation d'un coeur de rat est "dépendante du niveau de charge" ou "sensible à la charge" et s'avère très différente de celle du coeur de grenouille.

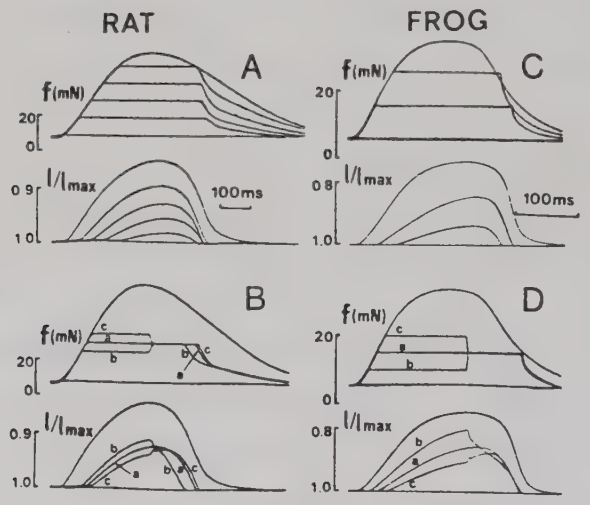



FIG.15

En effet, lorsque la charge augmente, la fin de la phase de relaxation isotonique survient différemment dans l'un ou l'autre tissu cardiaque. Ce phénomène est encore observé sur la Figure 16 : trois contractions a, b et c s'opèrent initialement à trois différents niveaux de charge et sont ultérieurement "clampées" au même niveau de charge. Dans le coeur de mammifère (Fig. 16 A) les phases de relaxation isométrique de a, b et c sont distinctes les unes des autres et surviennent avant la relaxation de la contraction d qui se déroule entièrement de façon isométri-

que. A l'inverse, chez la grenouille (Fig. 16 B), toutes les phases de relaxation isométrique surviennent en même temps dans les quatre contractions a, b, c et d, indépendemment des conditions de charge préalables. La Figure 16 A est caractéristique du coeur de mammifère dont la relaxation est dépendante du niveau de charge ("load dependent relaxation") ; la Figure 16 B caractérise le tissu myocardique de grenouille dont la relaxation est indépendante du niveau de charge ("load insensitive" ou "inactivation dependent relaxation").

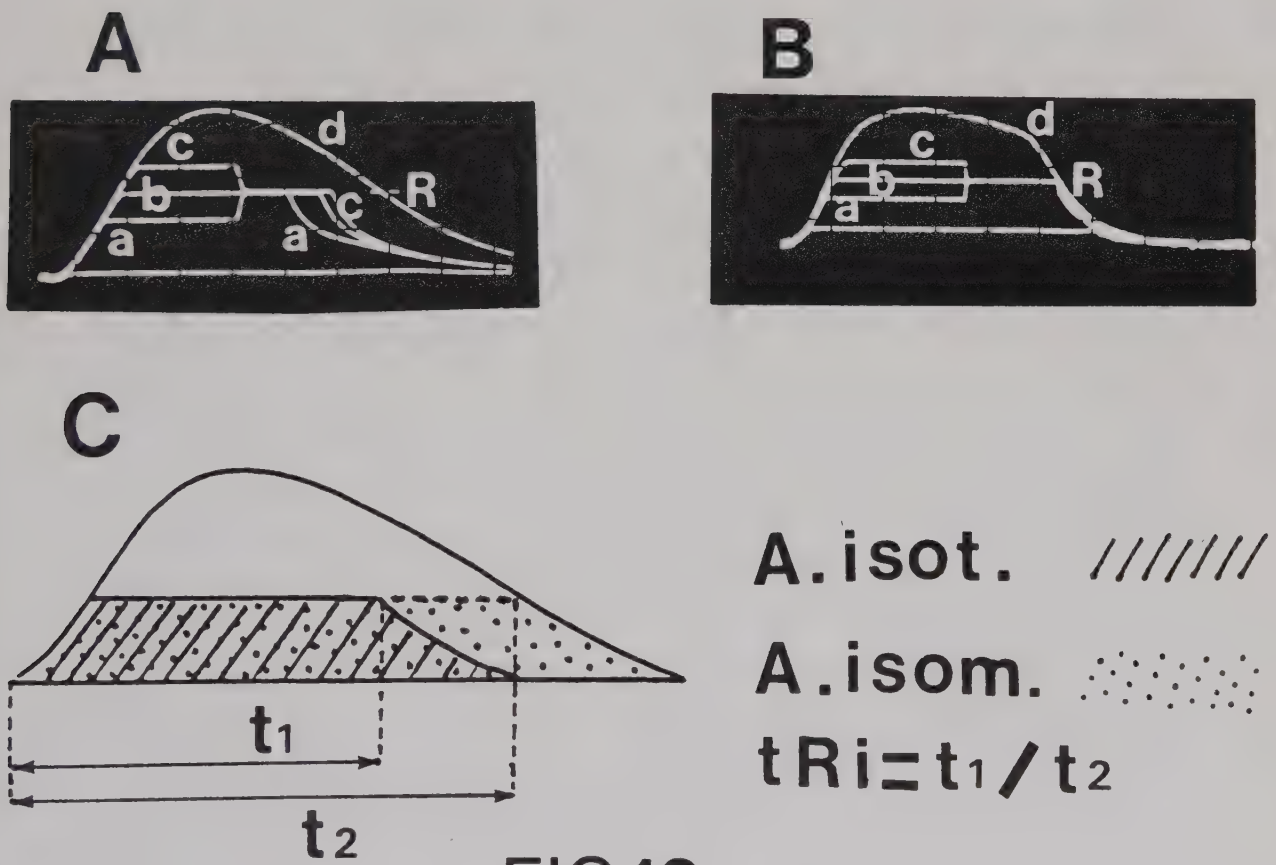



FIG.16

Nous allons exposer les arguments expérimentaux montrant que le réticulum sarcoplasmique participe à la régulation du phénomène de dépendance de la relaxation

selon le niveau de charge. Nous montrerons ensuite comment la mesure des sarcomères par diffraction laser permet de mieux comprendre les relations entre la charge et la décroissance du taux de calcium cytoplasmique. Celui-ci dépend entr'autres mécanismes de l'affinité de la troponine C pour le calcium et des capacités de recaptage du calcium par les différents "réservoirs" intracellulaires (réticulum sarcoplasmique, sarcolemne, échante Na-Ca, etc...)

## B - RAPPORTS ENTRE RETICULUM SARCOPLASMIQUE FONCTIONNEL ET "SENSIBILITE DE LA RELAXATION A LA CHARGE"

### 1) Destruction ou inhibition du réticulum sarcoplasmique dans le coeur de mammifère

Nous avons vu que l'aspect observé sur la Figure 16 A était caractéristique d'un type de relaxation cardiaque "sensible à la charge" communément observé chez le mammifère. Cette "sensibilité à la charge" s'exprime d'ailleurs plus fortement chez certains mammifères que chez d'autres (BRUTSAERT et coll, 1978 a). En détruisant chimiquement le réticulum sarcoplasmique de la cellule cardiaque isolée par le détergent BRIJ 58 (ORENTLICHER et coll, 1974), ou en inhibant ses capacités de recapter le calcium par la caféine (WEBER et HERZ, 1968), la relaxation type mammifère (Figure 16 A) se modifie et devient semblable à l'aspect observé chez la grenouille (Figure 16 B). Ces résultats ont été décrits en détail par BRUTSAERT et coll (1978 b, 1980) et LECARPENTIER et coll (1979). Si on détruit ou inhibe le réticulum sarcoplasmique dans le coeur de mammifère, la relaxation perd sa "sensibilité à la charge". Le mécanisme d'inactivation, lui-même indépendant des conditions

de charge, devient alors dominant, voire exclusif. Ainsi deux mécanismes, au moins, participent à la régulation de la relaxation et leur importance respective l'un par rapport à l'autre détermine le comportement mécanique du muscle pouvant être intermédiaire entre les deux aspects extrêmes A et B de la Figure 16.

2) La relaxation du myocarde de grenouille

Nous avons vu précédemment que la relaxation du myocarde de grenouille n'était pas sensible aux variations de la charge et dépendait essentiellement des processus d'"inactivation". Cela va parallèlement avec la classique pauvreté du réticulum sarcoplasmique dans ce tissu (STALEY et BENSON, 1968). Cependant des arguments morphologiques (S. PAGE et R. NIEDERGERKE, 1972) et biochimiques (S. WINEGRAD, 1971), tendent à montrer que le réticulum sarcoplasmique pourrait jouer un rôle dans le myocarde de la grenouille (S. WINEGRAD, 1976).

Nous avons pu, dans certaines conditions particulières, faire apparaître durant la relaxation du myocarde de grenouille la "sensibilité à la charge" (LECARPENTIER et coll, 1979). Cela fut attribué à une modification de l'importance relative des deux mécanismes ci-dessus incriminés dans la relaxation. Ainsi dans les conditions expérimentales où l'on observe le phénomène de sensibilité à la charge chez les mammifères, celui-ci n'est pas observé chez la grenouille. Il ne serait pas totalement absent pour autant, mais masqué par le phénomène d'"inactivation" nettement prédominant. La prédominance respective des deux mécanismes s'inverserait dans un milieu riche en calcium, pauvre en sodium ou bien encore contenant de l'ouabaïne ($10^{-5}$ M), expliquant que dans ces conditions la relaxation

devienne sensible à la charge dans le myocarde de grenouille.

3) Comment quantifier le degré de "sensibilité de la relaxation à la charge"

Deux indices permettent de quantifier le degré de "sensibilité de la relaxation" selon le niveau de charge. La détermination de ces deux indices est résumée sur le schéma C de la Figure 16. Le premier indice rapport de deux surfaces A.isot/A.isom fut proposé par D. BRUTSAERT et Y. LECARPENTIER. Il est égal à 0,8 dans le myocarde de rat et tend vers 1 dans le myocarde de grenouille. Lorsqu'on augmente progressivement la concentration extracellulaire de calcium de 2,5 à 7,5 mM, l'indice A.isot/A.isom décroît progressivement de 1 à 0,8. Lorsque $[Ca^{2+}]e = 7,5$ mM la relaxation du myocarde de grenouille se comporte comme celle du myocarde de rat (LECARPENTIER et coll, 1979). Cela montre que l'on peut modifier les caractéristiques de la relaxation selon tous les intermédiaires entre les deux aspects extrêmes "type mammifère" d'une part, et "type grenouille" d'autre part en modifiant de façon adéquate la composition du milieu extracellulaire.

Le second indice fut proposé par L. CHUCK et coll (1981). Il s'agit de l'indice tRi, rapport de deux temps : $tRi = t1/t2$. Cet indice varie linéairement en fonction de la charge. Plus la relaxation du muscle est sensible à la charge, plus la pente de la relation linéaire est grande (voir Figure 2 de l'article "Load sensitivity of relaxation in the foetal and newborn rabbit heart" par J. HOERTER et Y. LECARPENTIER, 1983).

Nous avons établi que les deux indices relatés ci-

dessus ( A.isot/A.isom et tRi) variaient parallèlement et que l'un n'était pas plus sensible que l'autre pour tester le degré de sensibilité de la relaxation à la charge (voir article soumis :"La relaxation cardiaque au cours de l'hypertrophie myocardique chronique expérimentale : le rôle du réticulum sarcoplasmique", par Y. LECARPENTIER et coll, 1983).

4) Modifications de la sensibilité de la relaxation à la charge chez le mammifère foetus et nouveau-né

Plusieurs travaux montrent que le réticulum sarcoplasmique subit des changements morphologiques notables dans la période périnatale (HOERTER et coll, 1981 ; MARTONOSI, 1982 ; PAGE et BUECKER, 1981). Cette période s'accompagne aussi de profondes modifications fonctionnelles du réticulum sarcoplasmique (NAYLER et FASSOLD, 1977 ; FABIATO et FABIATO, 1978). Nous avons étudié chez le lapin et chez le rat les relations entre le développement morphologique et fonctionnel du réticulum sarcoplasmique et les modifications de la relaxation. C'est lorsque le tissu cardiaque acquiert un réticulum sarcoplasmique fonctionnellement actif que la relaxation devient "sensible à la charge".

a - Chez le lapin foetus et nouveau-né

La relaxation du coeur de lapin foetus n'est pas "sensible à la charge" lorsque la fréquence de stimulation est de 10/mn et se comporte comme le myocarde de grenouille. A la naissance, la "sensibilité à la charge" apparait, ce que traduit une augmentation de la pente de l'indice tRi. La pente de tRi en fonction de la charge après la

naissance n'augmente plus. La naissance constitue donc une période de transition durant laquelle la relaxation se modifie et acquiert les caractéristiques du coeur de lapin adulte. Ces résultats sont détaillés dans l'article "Load sensitivity of relaxation in the foetal and newborn rabbit heart" par J. HOERTER et Y. LECARPENTIER (1983). En outre PAGE et BUECKER (1981) ont montré que la densité de la surface des dyades augmentait soudainement quelques jours avant la naissance et restait stable ensuite après la naissance. D'un point de vue chronologique ces modifications morphologiques coïncident avec les changements mécaniques observés au cours de la relaxation.

b - Chez le rat nouveau-né

FABIATO et FABIATO (1972, 1975, 1977) ont montré qu'une concentration critique de calcium externe par rapport au réticulum sarcoplasmique provoquait hors de celui-ci une sortie de calcium induisant la génération d'une force au niveau des myofilaments ($Ca^{2+}$-induced calcium-release). L'induction de l'extrusion du calcium par le calcium hors du réticulum sarcoplasmique n'est pas observée dans le myocarde de grenouille adulte ni dans le myocarde de rat nouveau-né ; il apparait au premier ou deuxième jour après la naissance et augmente progressivement atteignant une valeur maximale vers la troisième semaine (FABIATO et FABIATO, 1978).

Les Figs 17 et 18 montrent que chez le rat nouveau-né la relaxation n'est pas sensible à la charge. Elle se comporte comme le tissu myocardique de grenouille (Figure 16 B), indépendamment de la charge et dominée par le mécanisme d'"inactivation". L'indice A.isot/A.isom, testant la "sensibilité à la charge" est égal à $0,95 \pm 0,01$ ($n = 14$)

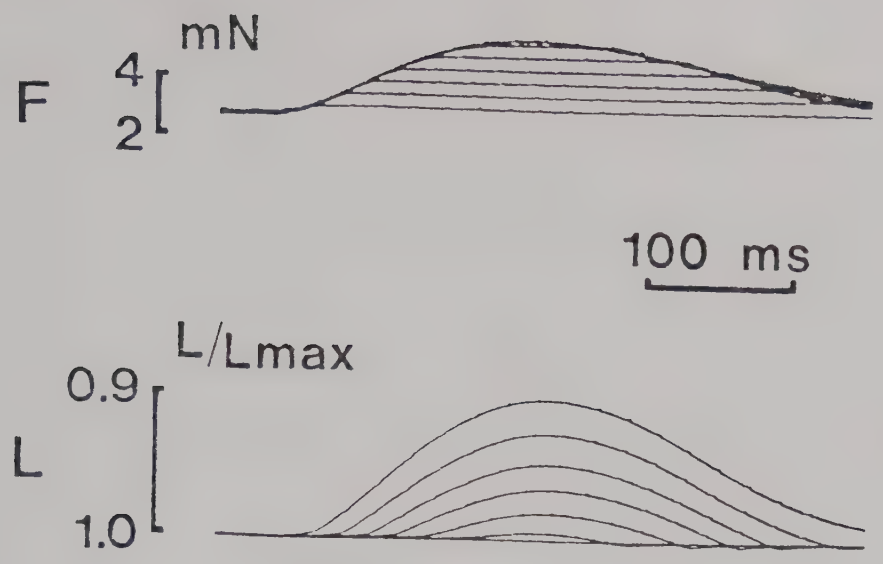



FIG.17

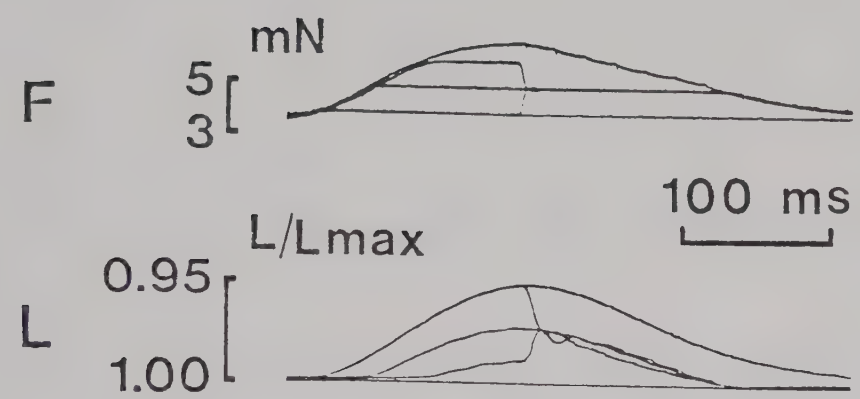



FIG.18

dans le myocarde de rat nouveau-né. Cette valeur est identique à celle observée dans le myocarde de grenouille adulte. A l'âge de trois semaines, A.isot/A.isom est égal à 0,79 ± 0,01 (n = 12), valeur similaire à celle observée à l'âge adulte (0,81 ± 0,02 ; n = 12).

Dans la période post-natale il y a donc un changement fonctionnel profond marqué par l'acquisition et le développement des capacités d'extrusion du calcium hors du réticulum sarcoplasmique, qui va de pair avec l'apparition de la "sensibilité de la relaxation à la charge". Chez le rat ces deux propriétés sont absentes à la naissance et par-

viennent à maturité vers l'âge de trois semaines.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux montre les rapports étroits existant entre la fonction de recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique et la modulation de la relaxation en fonction des conditions de charge.

La mesure de la longueur instantanée des sarcomères simultanément à celle du muscle entier va nous permettre d'apporter des arguments expérimentaux supplémentaires à la connaissance de la physiologie de la relaxation cardiaque.

## C - LA RELAXATION DES SARCOMERES : MESURE PAR DIFFRACTION LASER

Jusqu'alors, la relaxation des sarcomères cardiaque a essentiellement été étudiée sur des préparations musculaires se contractant en mode isométrique (KRUEGER et STROBECK, 1978 ; KRUEGER et FARBER, 1980). Notre appareillage optique et électronique nous permet d'étudier la relaxation des sarcomères sur de fines trabécules cardiaques, se contractant à tous les niveaux de charge possibles entre la charge nulle et la charge "isométrique". Les résultats de ce travail sont détaillés dans l'article "Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction" par Y. LECARPENTIER et coll. Nous en résumerons ici les principaux points.

Quatre contractions a, b, c et d préchargées à Lmax et ayant des charges totales croissantes sont représentées sur la Figure 11, p. 47. Les sarcomères lors de la contrac-

tion a avec précharge seule se relaxent très rapidement. Lors de la contraction d, dite "isométrique" ils se relaxent plus tardivement et lentement. Au cours de la relaxation des contractions b et c, on observe deux phases successives et de décroissance exponentielle : une première phase rapide, suivie d'une seconde plus lente. La transition entre ces deux phases correspond à la transition entre les phases de relaxation isotonique et isométrique. De plus, lorsque la charge augmente, la constante de temps de la première phase augmente alors que celle de la seconde diminue. Les constantes de temps $\tau_1$ et $\tau_2$ varient linéairement en fonction de la charge totale et sont représentées en pourcentage de la tension totale isométrique (% TT) sur la Figure 19 :
% TT = 0,2 $\tau_1$ + 4,8 (r = 0,83) et % TT = -0,1 $\tau_2$ + 157 (r = 0,97).

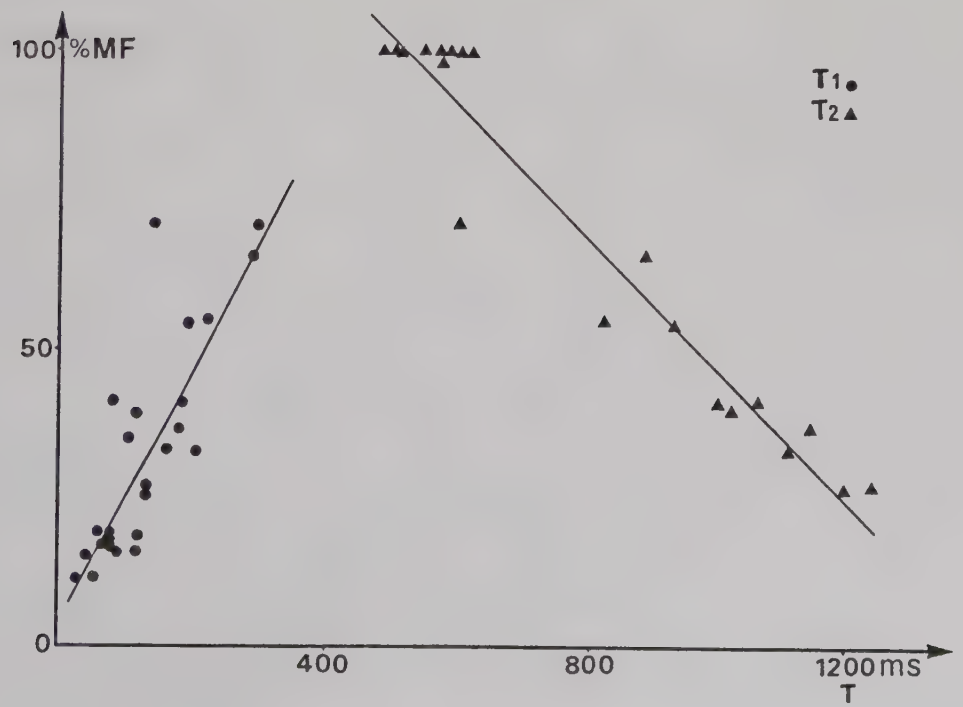



FIG.19

Lorsque la charge totale est relativement élevée, les constantes de temps $\tau_1$ et $\tau_2$ ne sont pas très différentes, ce qui rend imprécise la détermination exacte de la transition entre la phase rapide et la phase lente.

La Figure 20 montre la "sensibilité des sarcomères aux variations de charge". La charge des contractions b et c est modifiée de sorte que leur charge totale finale soit égale à celle de la contraction a. La variation de charge lors de la contraction c est tardive et entraîne une relaxation prématurée des sarcomères et du muscle entier. Les variations de charge imposées à des instants différents sur la Figure 20 modifient essentiellement le début de la phase rapide de relaxation des sarcomères mais ne changent pas la phase lente. La partie terminale de la phase lente est commune pour les trois contractions a, b et c. Le même phénomène est observé sur la Figure 21, où les variations de charge sont imposées au même instant mais d'amplitude variable. Pour un niveau déterminé de la charge totale, le déclenchement de la phase rapide dépend des conditions de charge alors que la phase lente en est indépendante. La phase rapide de relaxation des sarcomères est sensiblement contemporaine de la phase de relaxation isotonique du muscle entier. Or nous avons vu précédemment que la fin de la phase de relaxation isotonique du muscle cardiaque variait en fonction des conditions de charge chez le mammifère (Fig. 16 A), ce qui n'est pas le cas dans le myocarde de grenouille (Fig. 16 B). Nous avons vu aussi que le réticulum sarcoplasmique était nécessaire pour moduler la fin de la phase de relaxation isotonique en fonction de la charge. La phase rapide de relaxation des sarcomères étant contemporaine de la phase de relaxation isotonique du muscle est donc probablement sous la dépendence du réticulum sarco-

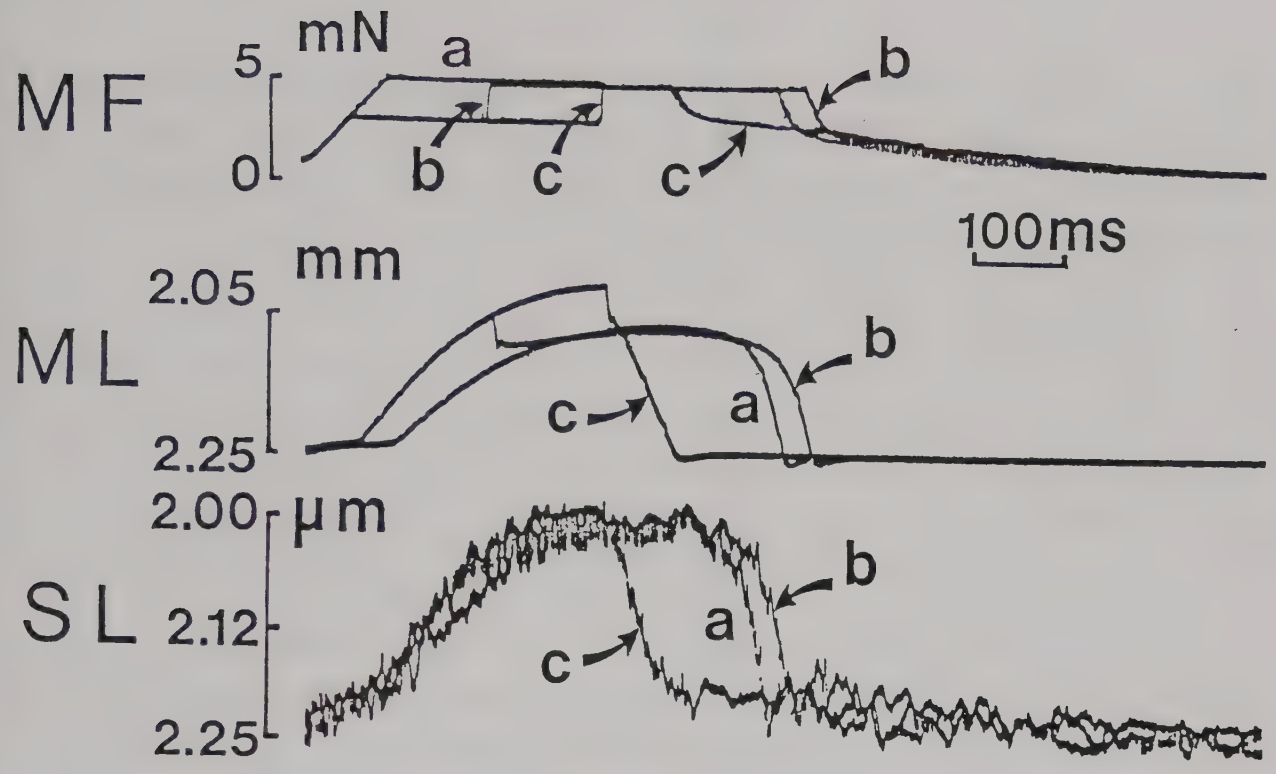

MF
mN
5
0
a
b
b
c
c
100ms
ML
mm
2.05
2.25
b
c
a
SL
2.00
µm
2.12
2.25
b
a
c

FIG.20

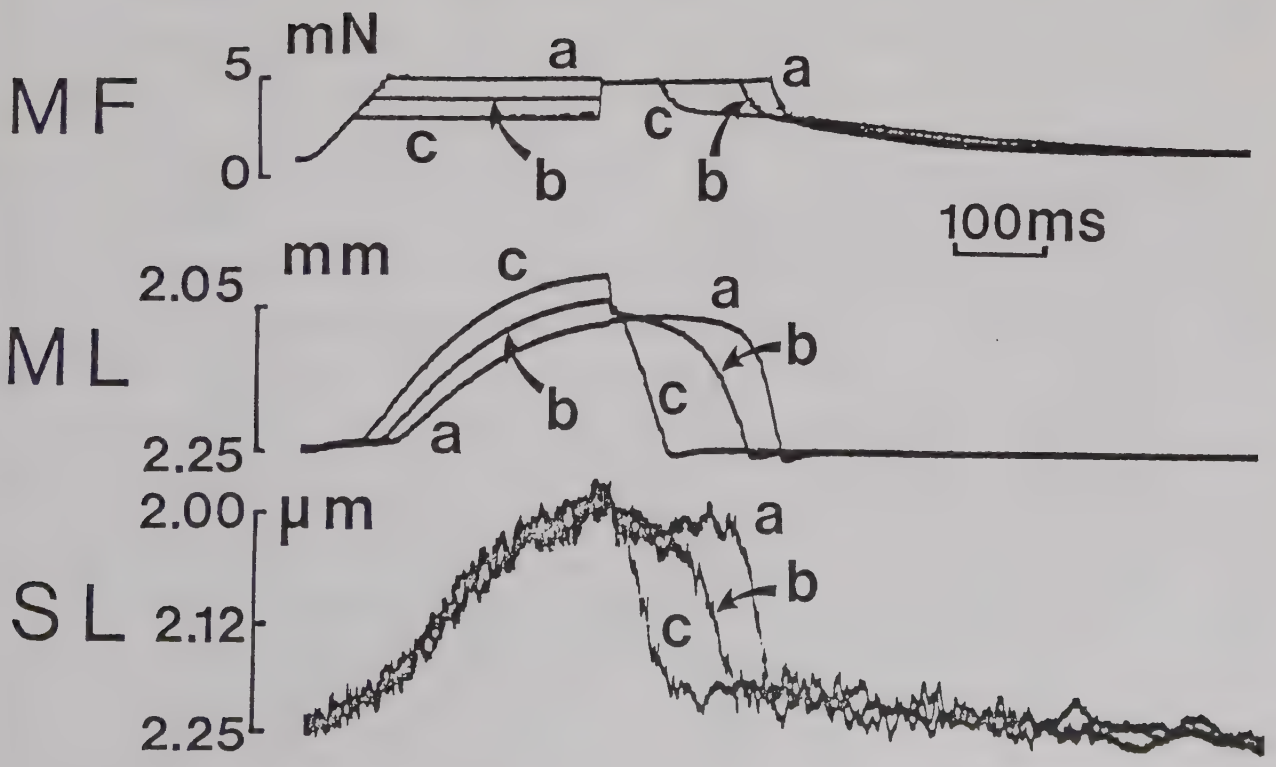

MF
mN
5
0
a
a
c
b
c
b
100ms
ML
mm
2.05
2.25
c
a
b
a
b
c
SL
2.00
µm
2.12
2.25
a
b
c

FIG.21

plasmique. Celui-ci participe, du moins en partie à réguler le début et la durée de la phase rapide $\tau_1$ en fonction des variations de la charge totale. La phase lente dépend du niveau de la charge (Fig. 19), mais pour un niveau final donné de celle-ci est indépendante des éventuelles modifications de charge au cours de la contraction (Fig. 20 et 21). L'action inotrope négative du Vérapamil sur la contraction des sarcomères a été montrée sur la Figure 14. On peut y remarquer que la relaxation est notablement modifiée : (i) la vitesse maximum de relaxation des sarcomères est diminuée, (ii) la phase rapide de relaxation des sarcomères est retardée et sa constante de temps $\tau_1$ est allongée, (iii) par contre la phase lente n'est pas significativement différente au cours des deux contractions a et b (Fig. 14). S. U. SYS et coll (1981) ont observé que le Vérapamil diminuait la "sensibilité de la relaxation à la charge". L'allongement de $\tau_1$ et la diminution de la "sensibilité à la charge" sous Vérapamil renforcent l'hypothèse de considérer le réticulum sarcoplasmique comme étant un des éléments régulateurs de la phase rapide de relaxation des sarcomères (à la fois de son début et de sa constante de temps $\tau_1$). La phase rapide ($\tau_1$) assure la majeure partie de la relaxation des sarcomères, et cela d'autant plus que la charge est faible. Lorsque la charge s'élève, l'importance de la phase lente augmente, de sorte que seule celle-ci persiste lors de la contraction "isométrique". L'influence du réticulum sarcoplasmique sur la cinétique de relaxation des sarcomères serait donc proportionnellement plus importante à faible charge qu'à forte charge, du fait de la prédominance de la phase rapide $\tau_1$ à faible charge. Du fait que les constantes de temps $\tau_1$ et $\tau_2$ sont différentes, les mécanismes intracellulaires régulant les cinétiques des phases rapide et lente sont

distincts, au moins partiellement. Divers auteurs ont montré que la charge et/ou le raccourcissement du muscle pouvait modifier l'affinité de la troponine C pour le calcium. R. BREMEL, J. M. MURRAY et A. WEBER (1972), WEBER et coll (1973), FUCHS (1978) ont montré que la combinaison de filaments d'actine et de myosine sous forme de complexes de "rigor"* modifiait l'affinité de la troponine C pour le calcium. D. G. ALLEN et S. KURIHARA (1982) ont suggéré que la constante d'affinité de la troponine C pour le calcium pouvait être influencée par la force développée, la variation de chacune d'entr'elles se faisant dans le même sens. M. ENDO (1973) a montré que la sensibilité des fibres squelettiques "pelées" vis à vis du calcium dépendait de la longueur des sarcomères et supposa que l'affinité de la troponine C pour le calcium pourrait être plus basse aux courtes longueurs de sarcomères. Plus récemment P. HOUSMANS et coll (1983) invoquèrent le même mécanisme pour interpréter leurs mesures de luminescence de l'aequorine dans le coeur de mammifère. Les travaux suggèrent que la force générée par le muscle augmente l'affinité de la troponine C pour le calcium et/ou que le raccourcissement des sarcomères entraine un effet inverse.

Cette hypothèse convient à l'interprétation de nos résultats : (i) à faible charge, le raccourcissement des sarcomères est important, de sorte que l'affinité de la troponine C pour le calcium diminue (ou augmente peu). Le calcium a tendance alors à se dissocier rapidement de la troponine C pour être ensuite recapté par le réticulum sarcoplasmique. La dissociation du $Ca^{2+}$ de la troponine C inhibe la reconstitution de nouveaux ponts actine-myo-

---

*Les complexes de "rigor" sont définis comme des complexes entre actine et myosine sans nucléotides liés. En l'absence d'ATP, tous les complexes actine-myosine sont des complexes de "rigor". A une concentration "infinie" d'ATP, il n'y en a aucun (BREMEL et WEBER, 1972).

sine. Les capacités de recaptage du calcium par les divers compartiments concernés (réticulum sarcoplasmique, sarcolemne, etc...) et le mécanisme d'échange sodium-calcium conditionnent la cinétique de décroissance du taux de calcium intracellulaire ; ainsi s'expliquerait la phase rapide ( $\tau_1$) de relaxation des sarcomères, spécialement nette à faible charge.

(ii) A forte charge, le raccourcissement des sarcomères est modéré, de sorte que l'affinité de la troponine C pour le calcium augmente plus (ou diminue moins) qu'à charge faible. Le calcium se dissocie de la troponine C plus lentement permettant le recyclage de nouveaux ponts actine-myosine prolongeant d'autant la force générée par le muscle. Ainsi s'expliquerait la phase lente ($\tau_2$) de la relaxation des sarcomères, d'autant plus importante que la charge est lourde.

Ainsi à faible charge, la cinétique de relaxation des sarcomères serait essentiellement liée aux capacités de recaptage du calcium dans les compartiments destinés à cet effet. A forte charge, la cinétique de relaxation des sarcomères dépendrait alors de la dissociation du calcium de la troponine C. La balance entre ces deux mécanismes serait modulée par le niveau de la charge.

La relaxation du muscle cardiaque fait intervenir un ensemble d'évènements intriqués dans lesquels le calcium tient un rôle important et où il est nécessaire de considérer :

(i) les cinétiques propres des ponts actine-myosine dépendant de l'activité ATPasique de la myosine,

(ii) les protéïnes contractiles régulatrices (complexe troponine et tropomyosine),

(iii) les sites de séquestration du calcium et tout particulièrement le réticulum sarcoplasmique chez les mammifères,

(iiii) la charge du muscle et le raccourcissement des sarcomères.

Nous discuterons de nouveau certains de ces points au chapitre suivant traitant de l'hypertrophie cardiaque induite par des surcharges hémodynamiques chroniques.

## CHAPITRE III

## MECANIQUE ET BIOCHIMIE AU COURS DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE.

Nous nous limiterons dans ce chapitre à certains points qui ont retenu notre attention au cours de l'hypertrophie cardiaque expérimentale chez le rat. Dans un premier temps nous discuterons les relations force-vitesse-raccourcissement lors des surcharges cardiaques chroniques de pression et de volume. Puis nous présenterons les corrélations entre les variations des paramètres de contractilité et certaines modifications biochimiques observées au cours de l'hypertrophie. Nous terminerons par la relaxation du tissu myocardique hypertrophié.

L'hypertrophie myocardique est dans les modèles expérimentaux présentés ici secondaire à une augmentation de travail cardiaque, qu'elle soit due à une surcharge de pression (sténose de l'aorte thoracique ou abdominale, hypertension artérielle expérimentale) ou à une surcharge de volume (insuffisance aortique, fistule aorto-cave). Les surcharges de pression et de volume peuvent être couplées (sténose aortique et insuffisance aortique, fistule aorto-cave chez des rats spontanément hypertendus). Ces différents types de surcharges myocardiques ont été largement développés par P. Y. HATT qui en a décrit les divers aspects histologiques en microscopie électronique (P. Y. HATT et coll, 1974, 1975, 1977 a et b, 1979 a et b). Du point de vue ul-

trastructural, les conséquences d'une surcharge hémodynamique chronique dépendent en partie de sa sévérité et de sa durée. Le myocarde, après une surcharge sévère et de courte durée diffère morphologiquement de celui observé après une surcharge modérée où seulement on peut décrire le classique schéma de MEERSON (1969) en trois stades (stade 1 : augmentation du travail par unité de poids : stade 2 : hypertrophie compensatrice ; stade 3 : défaillance cardiaque).

## A - RELATIONS FORCE-VITESSE-RACCOURCISSEMENT : CONSERVATION DE LA RELATION BIJECTIVE ENTRE VITESSE ET RACCOURCISSEMENT AU COURS DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE

L'augmentation du travail effectué par les myocytes au cours des surcharges chroniques a pour conséquence d'entraîner une hyperactivité métabolique et parfois une souffrance cellulaire voire une dégénérescence cellulaire. Lors de surcharges sévères, des lésions dégénératives apparaissent, telles une désorganisation myofibrillaire, une prolifération de petites mitochondries ou une hypertrophie inappropriée de tubules T ou L. Ces lésions pourraient être à l'origine de troubles de la contractilité par perte du synchronisme de la contraction des myofilaments due à l'inhomogénéité et à la dispersion des anomalies histologiques. La relation bijective indépendante du temps entre la vitesse et le raccourcissement du muscle montrée par D. L. BRUTSAERT (1974 b) dans le coeur de mammifère, suppose un certain degré de synchronisme de contraction des myocytes. Cela est corroboré par l'observation du même phénomène à l'échelon des sarcomères (Chap. I - C.1.b et Figure 9). De plus nous avons mentionné plus haut que

la dispersion de la longueur des sarcomères, étudiée par diffraction laser, n'augmentait pas très notablement au cours de la contraction par rapport au repos. Il existe donc un synchronisme de mouvement des sarcomères au sein d'une même cellule et des cellules entr'elles, du moins dans des préparations de petites dimensions.

Une désynchronisation importante du raccourcissement des cellules cardiaques hypertrophiées devrait se traduire par une altération de la relation biunivoque vitesse-raccourcissement. La perte du caractère bijectif de la correspondance entre vitesse et raccourcissement ne permettrait plus de construire le diagramme tridimensionnel F-V-L ni de calculer la vitesse maximale de raccourcissement à charge nulle par la méthode du "zéro-load-clamp". Nous avons donc étudié le diagramme tridimensionnel et la relation bijective vitesse-raccourcissement sur des muscles papillaires de coeur de rat soumis à des surcharges hémodynamiques prolongées, et pour certaines d'entr'elles sévères. Ce travail est présenté dans l'article : "Force-velocity-length relationship during cardiac hypertrophy" par Y. LECARPENTIER et coll (1983 a).

Quatre types de surcharges ont été effectués :

- insuffisance aortique (IA)
- sténose aortique (SA)
- fistule aorto-cave (FAC)
- sténose aortique + insuffisance aortique (SA + IA).

Certains rats présentèrent un tableau d'insuffisance cardiaque globale avec signes gauches (oedème pulmonaire) et signes droits (congestion hépatique, oedème cutané

important) spécialement au cours de quelques FAC et surcharges mixtes SA + IA. Dans tous les coeurs hypertrophiés, et même au stade d'insuffisance cardiaque congestive, la relation bijective entre vitesse et raccourcissement du muscle est conservée, à savoir : pour un niveau donné de la charge isotonique, la vitesse de raccourcissement s'adapte instantanément au raccourcissement, indépendamment du temps et de la longueur initiale ; à une valeur de la vitesse correspond une et une seule valeur de raccourcissement caractéristique d'un niveau de charge et d'un état inotrope déterminés. Il est donc possible de construire le diagramme tridimensionnel F-V-L à partir de muscles cardiaques hypertrophiés. Seules des anomalies quantitatives sont observées, se traduisant par des modifications de la position de la surface gauche F-V-L dans l'espace tridimensionnel. La Vmax, représentant une valeur particulière et caractéristique du niveau de la surface F-V-L est donc mesurable par la méthode du "zéro-load-clamp". Vmax diminue dans les divers modèles d'hypertrophie étudiés et dépend du type et/ou de la durée de la surcharge.

Le fait que la relation vitesse-raccourcissement soit "indépendante du temps" témoigne d'une régulation de l'équilibre du degré d'activation, résultant de l'interaction de multiples facteurs, les uns favorisant l'activation cellulaire, les autres l'inhibant*. La régulation de l'équilibre du niveau d'activation est conservée au cours de l'hypertrophie cardiaque puisque la relation vitesse-raccourcissement durant une partie précise de la phase isoto-

---

*This time independence probably reflects a perfect equilibrium of the degree of activation due to the interaction of multiple activating and deactivating influences rather than a constant level of activating calcium at the cross-bridges or than a unique feature of actin and myosin interaction. (D. L. BRUTSAERT, 1974 b).

nique demeure indépendante du temps. Il y a donc, lors des surcharges cardiaques, un déplacement de "l'équilibre du degré d'activation", à une valeur inférieure, durant la partie de la contraction où est observée l'indépendance du temps entre la vitesse de raccourcissement et le raccourcissement. Les surcharges myocardiques chroniques chez le rat ne rompent pas l'équilibre existant entre activation et inactivation, qui se fixe à un niveau plus bas et se maintient plus longtemps.

## B - CORRELATIONS ENTRE MODIFICATIONS MECANIQUES ET BIOCHIMIQUES AU COURS DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE

### 1) La myosine : site de l'activité catalytique ATPasique

L'énergie utilisée pour la contraction provient de l'hydrolyse de l'ATP. La tête de la myosine est le siège du site enzymatique. V. ENGELHARDT et M. LYUBIMOVA découvrirent en 1939 l'activité ATPasique de la myosine :

$$ATP + H_2O \rightleftarrows ADP + Pi + H^+$$

Cette réaction constitue une source immédiate d'énergie utilisable pour la contraction musculaire. L'activité ATPasique de la myosine est très augmentée en présence de quantités stoïchiométriques d'actine F : le "turnover" augmente alors de 200 fois, de 0,05 $sec^{-1}$ à 10 $sec^{-1}$. L'hydrolyse de l'ATP en présence de myosine seule est rapide mais la libération d'ADP et de Pi est lente. L'actine augmente le "turnover" du cycle de la myosine en se fixant au complexe myosine-ADP-Pi et en accélérant la libération d'ADP et de Pi. Le complexe actine-myosine peut alors fixer l'ATP, ce qui conduit à dissocier l'actine de

la myosine. Le complexe ATP-myosine est alors prêt à effectuer un nouveau cycle. Edwin TAYLOR a montré que l'actine présente une haute affinité pour la myosine et pour le complexe myosine-ADP-Pi, mais a une affinité basse pour le complexe myosine-ATP. Il s'ensuit que l'actine, alternativement se fixe à la myosine et se dissocie de celle-ci lors de l'hydrolyse de l'ATP.

### 2) Avantages au plan thermodynamique d'un système utilisant l'ATP

#### a - Bref rappel de thermodynamique

La première loi de la thermodynamique spécifie que l'énergie totale d'un système et de son environnement est constante :

$$\Delta E = E_B - E_A = Q - W$$

$E_A$ : énergie du système au début des réactions chimiques

$E_B$ : énergie du système à la fin des réactions chimiques

$Q$ : la chaleur absorbée par le système

$W$ : le travail effectué par le système.

La seconde loi de la thermodynamique spécifie qu'un processus chimique peut survenir spontanément si la somme des entropies du système et de son environnement augmente. En biologie, cependant, les variations d'entropie lors des réactions chimiques ne sont pas aisément mesurables. Cette difficulté a été tournée par J. W. GIBBS en utilisant une autre fonction thermodynamique combinant la première et la seconde loi de la thermodynamique appelée énergie libre G.

La variation d'énergie libre s'écrit :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$\Delta G$ est la variation d'énergie libre d'un système subissant une transformation à pression constante P et à température T. L'avantage de cette fonction est de ne pas faire intervenir les propriétés de l'environnement du système.

$\Delta H$ est la variation d'enthalpy du système

$\Delta S$ est la variation d'entropie du système

$$\Delta H = \Delta E + P \Delta V$$

Les variations de volume $\Delta V$ sont faibles dans presque toutes les réactions biochimiques donc $\Delta H \simeq \Delta E$

donc $\Delta G \simeq \Delta E - T\Delta S$.

La variation d'énergie libre $\Delta G$ d'une réaction, contrairement à la variation d'énergie interne $\Delta E$ représente un critère utilisable pour savoir si cette réaction peut ou non survenir spontanément :

- une réaction peut survenir spontanément si la variation d'énergie libre $\Delta G$ est négative.
- Si $\Delta G = 0$, le système est en équilibre.
- Si $\Delta G > 0$, la réaction ne peut pas survenir spontanément. Un apport d'énergie libre est alors requis afin qu'elle s'effectue.

Soit la réaction

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \operatorname{Log}_e \frac{[C]\ [D]}{[A]\ [B]}$$

où $\Delta G^\circ$ est la variation d'énergie libre dans les conditions standards (c'est-à-dire que chacun des réactifs A, B, C et D est à concentration 1 M).

Par convention, $\Delta G°'$ est la variation d'énergie libre standard à pH = 7

à l'équilibre, $\Delta G = 0$

$$\Delta G°' = - RT \log_e \frac{[C]\,[D]}{[A]\,[B]}$$

La constante d'équilibre dans les conditions standards $K'_{eq}$ est définie ainsi :

$$K'_{eq} = \frac{[C]\,[D]}{[A]\,[B]}$$

d'où $\Delta G°' = - RT \log_e K'_{eq} = - 2,3\ RT \log_{10} K'_{eq}$

ce qui s'écrit

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G°'/2,3\ RT}$$

ou $R = 1,98.10^{-3}$ kcal.mol$^{-1}$.deg$^{-1}$

et $T = 298$ °K

et ce qui donne à 25°

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G°'/1,36}$$

Une réaction chimique thermodynamiquement défavorable peut s'effectuer conjointement et grâce à une autre réaction, qui elle, est favorable du point de vue thermodynamique. La somme des variations d'énergie libre dans une série de réaction est égale à la somme des variations d'énergie libre de chacune des réactions de la série.

### b - L'ATP constitue une source universelle d'énergie libre dans les systèmes biologiques

L'ATP est utilisé :

. pour le travail mécanique lors de la contraction musculaire,

. pour le transport actif des molécules et des ions,

. pour la synthèse des macromolécules.

L'ATP est un donneur immédiat d'énergie, plutôt qu'une forme de stockage d'énergie. Dans une cellule vivante, le turnover de l'ATP est très élevé et une molécule d'ATP est consommée en moyenne en moins d'une minute après sa formation.

Au cours de la réaction

$$ATP + H_2O \rightleftarrows ADP + Pi + H^+$$

la variation d'énergie libre standard $\Delta G°'$ est de 7,3 kcal/mol.

### c - Modifications thermodynamiques induites par l'hydrolyse de l'ATP dans le système actine-myosine

Nous avons vu précédemment la réaction

$$Actin - Myosine + ATP + H_2O \rightleftarrows Actine + ADP + Pi + Myosin \quad (1)$$

Lorsque l'on ajoute de la myosine à une solution d'actine seule, il y a formation d'un complexe d'actomyosine, dont la viscosité diminue en ajoutant de l'ATP (A. SZENT-GYORGYI). La conversion de l'actomyosine en actine + myosine ne se fait pas spontanément. La variation d'énergie libre standard de la réaction $AM \rightleftarrows A + M$ est de l'ordre de grandeur de 4,3 kcal/mol, la constante d'équilibre $K'_{eq}$ de cette réaction est égale à (WHITE et TAYLOR, 1976) :

$$\frac{[A]\,[M]}{[AM]} = K'_{eq} = 10^{-\Delta G°'/1,36} = 1,4.10^{-6}$$

En présence d'ATP, la variation d'énergie libre standard de la réaction globale (1) est égale à la somme algébrique des variations d'énergie libre standard des deux réactions prises individuellement, soit 4,3 - 7,3 = - 3 kcal.

La constante d'équilibre de la réaction couplée (1) est égale à

$$K'_{eq} = \frac{[A]\,[M]}{[AM]} \cdot \frac{[ADP]_{eq}\,[Pi]_{eq}}{[ATP]_{eq}} = 10^{3}/1,36$$

$$K'_{eq} = 1,62 \times 10^{2}$$

Or les cellules génératrices d'ATP maintiennent un haut niveau d'ATP en oxydant certains substrats, de sorte que le rapport [ATP]/[ADP][Pi] soit de l'ordre de grandeur de 500.

Donc en présence d'ATP, à l'équilibre, le rapport $\frac{[A]\,[M]}{[AM]}$ devient égal à $1,62 \times 10^{+2} \times 500 = 0.81 . 10^{+5}$

L'hydrolyse de l'ATP permet donc la dissociation de l'actomyosine jusqu'à ce que le rapport [A] [M]/[AM] atteigne $0.81 . 10^{+5}$. L'hydrolyse couplée de l'ATP a donc changé le rapport des constantes d'équilibre d'un facteur $5.10^{10}$.

Ainsi une réaction chimique qui n'est pas spontanément favorable d'un point de vue thermodynamique, comme la dissociation de la molécule d'actomyosine en actine + myosine, peut le devenir en la couplant avec l'hydrolyse d'un nombre adéquate de molécule d'ATP.

Ainsi :

- l'ATP constitue la source d'énergie utilisée dans la contraction musculaire et permet sur le plan thermodynamique la dissociation spontanée de l'actomyosine en actine + myosine.
- L'actine accélère la libération de l'ADP et du Pi du complexe myosine - ADP - Pi.

- La tête de la myosine porte elle-même le site catalytique ATPasique.

L'activité ATPasique de la myosine conditionne la durée du cycle des ponts actine-myosine.

- L'activité ATPasique de la myosine est directement proportionnelle à la vitesse de contraction du muscle (BÁRÁNY, 1967 ; DELCAYRE et SWYNGHEDAUW, 1975).

3) L'activité ATPasique de la myosine : facteur participant à la régulation de la vitesse de contraction dans le tissu cardiaque normal et hypertrophié

a - La vitesse maximale de raccourcissement est fonction linéaire de l'activité ATPasique de la myosine

M. BÁRÁNY en 1967 a montré que l'activité ATPasique de la myosine de muscle squelettique était linéairement liée à la vitesse maximale de raccourcissement. Une relation linéaire directe analogue a aussi été observée dans le muscle cardiaque par C. DELCAYRE et B. SWYNGHEDAUW (1975).

Récemment, A. LOMPRE (1979, 1982) et J. J. MERCADIER (1951) ont montré que la répartition des isoenzymes de la myosine ($V_1$, $V_2$ et $V_3$) se modifiait au cours de l'hypertrophie cardiaque expérimentale chez le rat. L'activité $Ca^{2+}$-ATPasique de l'isoenzyme $V_1$ de la myosine est plus élevée que celle de l'isoenzyme $V_3$, celle de $V_2$ étant intermédiaire entre $V_1$ et $V_3$ (J. F. HOH et coll, 1977 ; B. POPE et coll, 1980). Il nous est donc apparu intéressant d'é-

tudier les variations de la vitesse maximale de raccourcissement en fonction des variations de chacun des isoenzymes $V_1$ et $V_3$ de la myosine au cours de l'hypertrophie cardiaque chez le rat. Nous avons observé (K. SCHWARTZ et coll, 1982) que la vitesse maximale de raccourcissement était une fonction linéaire directe du pourcentage d'isoenzyme $V_1$ et inverse du pourcentage d'isoenzyme $V_3$ dans le myocarde de rat soumis à des surcharges hémodynamiques chroniques ou après hypophysectomie. La signification de ce changement isozymique reste encore discuté : s'agit-il d'un processus pathologique ou bien d'un des mécanismes d'adaptation du tissu myocardique à de nouvelles conditions de charge ?

### b - Relation entre changement isozymique de la myosine et modification de la vitesse maximale de raccourcissement

α) Les pourcentages des isoenzymes $V_1$ et $V_3$ de la myosine ont été étudiés chez des rats (i) normaux, (ii) après sténose de l'aorte abdominale, (iii) après hypophysectomie. Ils varient linéairement avec la vitesse maximale de raccourcissement selon les relations (K. SCHWARTZ et coll, 1982)

$$\% V_1 = 21,1 \text{ Vmax} - 11,7 \qquad (1)$$
$$\% V_3 = -26,4 \text{ Vmax} + 96 \qquad (2)$$

d'autre part :

$$\% V_1 + \% V_2 + \% V_3 = 100.$$

Les pentes des équations (1) et (2) sont sensiblement égales en valeur absolue et de signe opposé. On peut donc considérer que la pente de la relation linéaire $\% V_3$ en fonction de Vmax est peu différente de zéro. Donc la variation du pourcentage de $V_2$ est faible par rapport aux

variations en pourcentage de $V_1$ et $V_3$. Nous avons vérifié expérimentalement que le pourcentage moyen de $V_2$ sur 40 muscles papillaires normaux et hypertrophiés variait peu : $\% V_2 = 25 \pm 1 \%$.

β) Les valeurs de l'activité $Ca^{2+}$-ATPasique de chacun des isoenzymes $V_1$, $V_2$ et $V_3$ du ventricule de rat nous sont données par J. F. HOH et coll (1977) et B. POPE et coll (1980)

| Activités $Ca^{2+}$-ATPasique µmol Pi.mg myosine$^{-1}$.mn$^{-1}$ | $V_1$ | $V_2$ | $V_3$ |
|---|---|---|---|
| HOH et coll (1977) | 1,15 | 0,66 | 0,18 |
| POPE et coll (1980) | 0,822 | - | 0,278 |
| | 0,700 | - | 0,155 |

Soit $k_1$, $k_2$ et $k_3$ les valeurs moyennes des activités ATPasiques données expérimentalement par HOH et coll (1977) et POPE et coll (1980)

$k_1 = 0,89$ µmol Pi.mg myosine$^{-1}$.mn$^{-1}$
$k_2 = 0,54$ µmol Pi.mg myosine$^{-1}$.mn$^{-1}$
$k_3 = 0,19$ µmol Pi.mg myosine$^{-1}$.mn$^{-1}$

$k_1/k_3 = 4,6$

L'activité ATPasique globale moyenne ($k_G$) en µmol Pi.mg myosine$^{-1}$.mn$^{-1}$ est égale à

$$k_G = k_1 V_1 + k_2 V_2 + k_3 V_3$$

Nous avons vu que les variations de $V_2$ étaient faibles : donc $k_2 V_2 \simeq$ constante

En substituant les valeurs de $V_1$ et $V_3$ en fonction de Vmax on obtient :

$$\boxed{k_G = 0,14 \text{ Vmax} + 0,22}$$

| $V_{max}$ $l_{max}/s$ | 1 | 3 |
|---|---|---|
| % $V_1$ | 10 | 65 |
| % $V_3$ | 65 | 10 |
| $k_G$ mol.mg myosine$^{-1}$/mn$^{-1}$ | 0,35 | 0,63 |

Ce tableau montre qu'un muscle cardiaque normal se contractant avec une vitesse maximale de 3 $l_{max}/s$, et comportant 65 % de $V_1$ et 10 % de $V_3$ a une activité ATPasique globale moyenne de 0,63. Lorsque la vitesse maximale de raccourcissement diminue de 3 à 1 $l_{max}/s$, après surcharge prolongée, l'activité ATPasique globale moyenne $k_G$ diminue environ de moitié (de 0,63 à 0,35 soit 80 % de diminution).

Cela constitue une économie d'énergie considérable. La variation du pourcentage des isoenzymes de la myosine au cours des hypertrophies cardiaques peut être considérée comme un processus d'adaptation à la surcharge chronique. Cela aboutit à une baisse très importante de la consommation d'ATP par unité de poids de tissu et par unité de temps, au détriment de la performance mécanique dont témoigne la diminution de la vitesse maximale de raccourcissement.

Ces résultats ont été obtenus après sténose de l'aorte abdominale chez le rat, mais aussi après hypophysectomie. L'hypophysectomie induit une baisse de la contractilité intrinsèque du myocarde avec une diminution de la

fréquence cardiaque, de la pression artérielle, du débit et du travail cardiaque (BEZNAK, 1959). La baisse de la vitesse maximum de raccourcissement (B. KORECKY et B. BEZNAK, 1971) s'accompagne d'une baisse de l'activité ATPasique des myofibrilles ventriculaires (M. LIFSCHITZ et H. KAYNE, 1966) et de la myosine ventriculaire (A. HJALMARSON et coll, 1970 ; M. ROVETTO et coll, 1972). Les troubles de la contractilité sont en grande partie expliqués par l'hypothyroïdisme secondaire à l'hypophysectomie. La forme $V_3$ devient très largement prédominante après hypophysectomie ce qui explique la baisse importante de la vitesse maximale de raccourcissement.

### c - Chronologie des changements isozymiques de la myosine et des modifications de contractilité au cours de l'hypertrophie cardiaque

Nous avons étudié en collaboration avec Carl APSTEIN et le groupe SWYNGHEDAUW-SCHWARTZ trois groupes de rats ayant subi une insuffisance aortique, comparés à trois groupes témoins de même âge. La durée de l'insuffisance aortique fut de 4 à 7 semaines dans le groupe 1, de 10 à 13 semaines dans le groupe 2 et de 40 semaines dans le groupe 3. Les questions auxquelles ce travail s'était donné de répondre sont les suivantes :

- Les changements isozymiques de la myosine précèdent-ils les modifications de contractilité au stade de début de l'insuffisance aortique ?
- Les changements isozymiques de la myosine sont-ils liés à des paramètres de contractilité autre que la vitesse maximale de raccourcissement ?

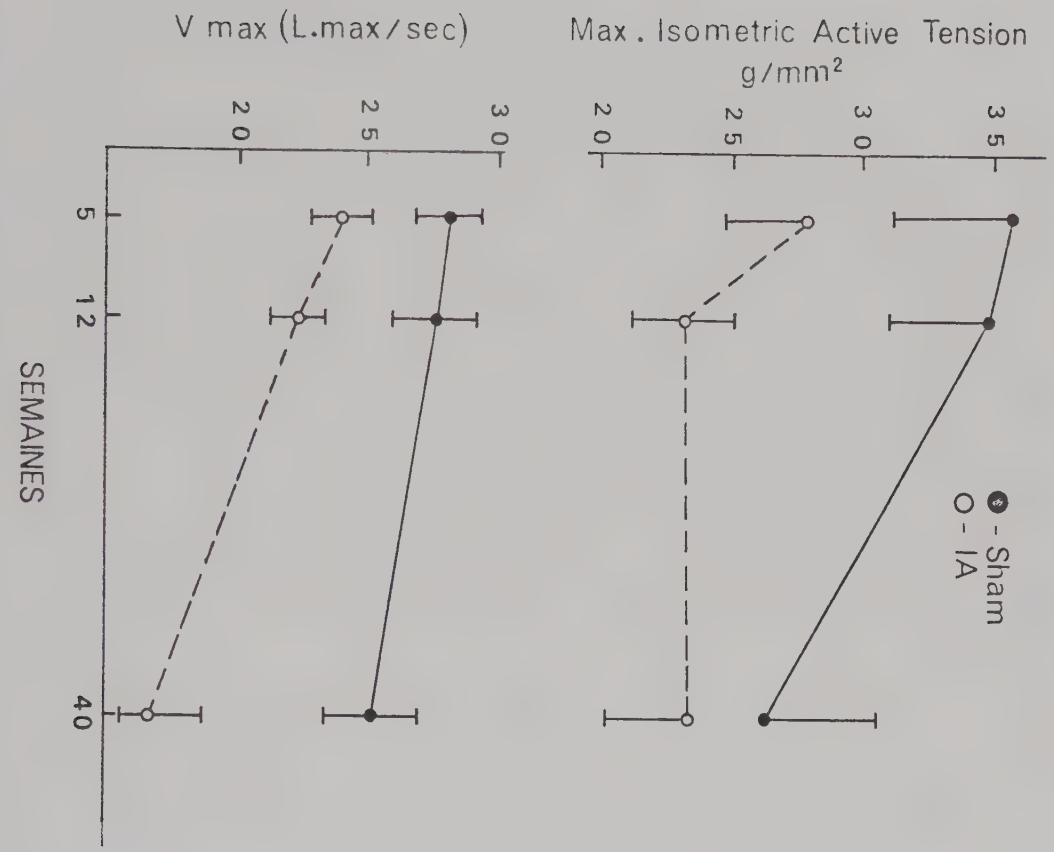

Max. Isometric Active Tension
g/mm²
20
25
30
35
● - Sham
O - IA
V max (L.max/sec)
20
25
30
5
12
40
SEMAINES

FIG.22

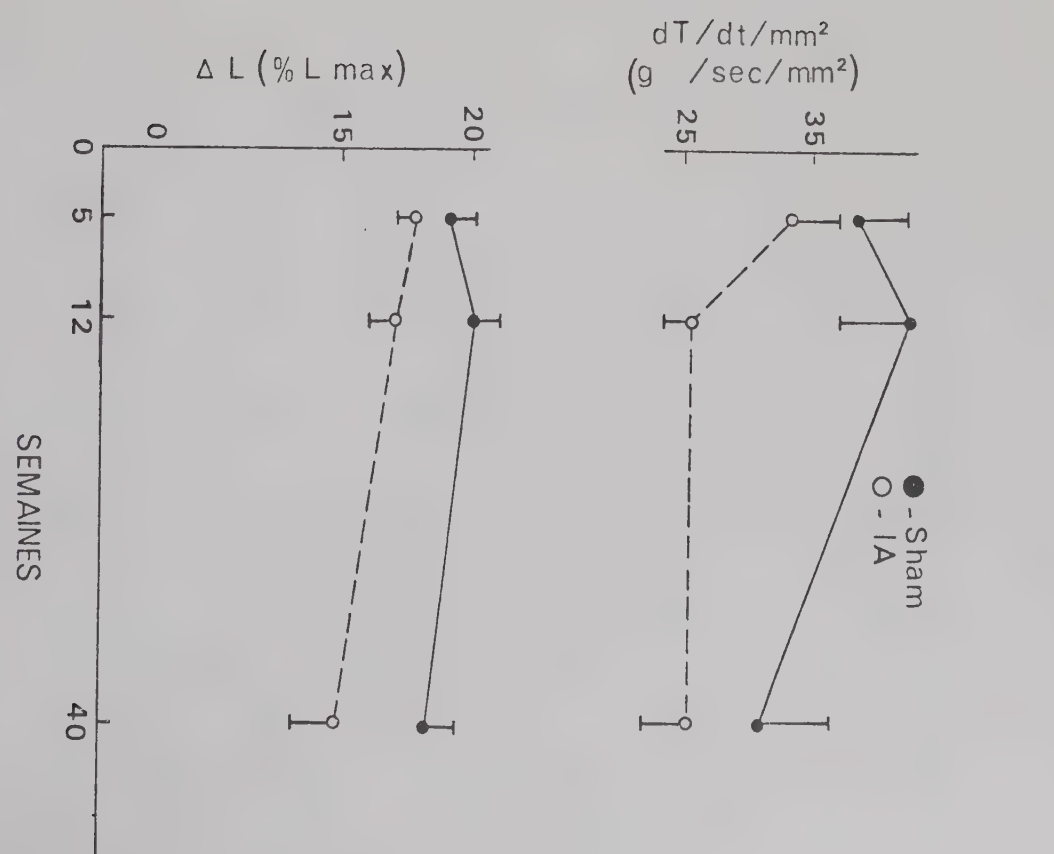

dT/dt/mm²
(g /sec/mm²)
25
35
● - Sham
O - IA
Δ L (% L max)
0
15
20
0
5
12
40
SEMAINES

FIG.23

α) Les figures 22, 23 et 24 montrent que des modifications significatives portant à la fois sur la contractilité et la composition isozymique de la myosine apparaissent dans le groupe 1 après 4 à 7 semaines d'insuffisance aortique. Cela se traduit par une baisse de la $V_{max}$, une baisse du pourcentage de $V_1$ et une augmentation de celui de $V_3$ ($p < 0,05$ par rapport au groupe témoin de même âge). Les autres paramètres de contractilité (ΔL : amplitude maximale de raccourcissement, maxTA/s : tension active maximale par $mm^2$, maxdT/dt/s : maximum de la dérivée par rapport au temps de la tension totale par $mm^2$) ne sont pas significativement diminués dans les IA du groupe A par rapport aux témoins de même âge.

Les modifications isozymiques de la myosine et de la $V_{max}$ au cours de l'insuffisance aortique chez le rat apparaissent statistiquement significatives dès le groupe 1 contrairement aux autres paramètres de contractilité.

β) La diminution de maxTA/s et de maxdT/dt/s (Fig. 22 et 23) est essentiellement liée à une augmentation de la section des muscles (voir tableau ci-dessous)

| | Précharge | Section (s) $mm^2$ | Précharge/$mm^2$ |
|---|---|---|---|
| SHAM 4 à 7 semaines (n = 11) | 0,68 ± 0,03 | 1,09 ± 0,06 | 0,64 ± 0,03 |
| IA 4 à 7 semaines (n = 19) | 0,73 ± 0,02 | 1,55 ± 0,07 | 0,49 ± 0,03 |
| SHAM 10 à 13 semaines (n = 11) | 0,73 ± 0,02 | 1,13 ± 0,07 | 0,67 ± 0,05 |
| IA 10 à 13 semaines (n = 19) | 0,76 ± 0,02 | 1,84 ± 0,10 | 0,43 ± 0,02 |
| SHAM 40 semaines (n = 7) | 0,79 ± 0,03 | 1,56 ± 0,11 | 0,51 ± 0,03 |
| IA 40 semaines (n = 6) | 0,92 ± 0,04 | 1,82 ± 0,09 | 0,51 ± 0,02 |

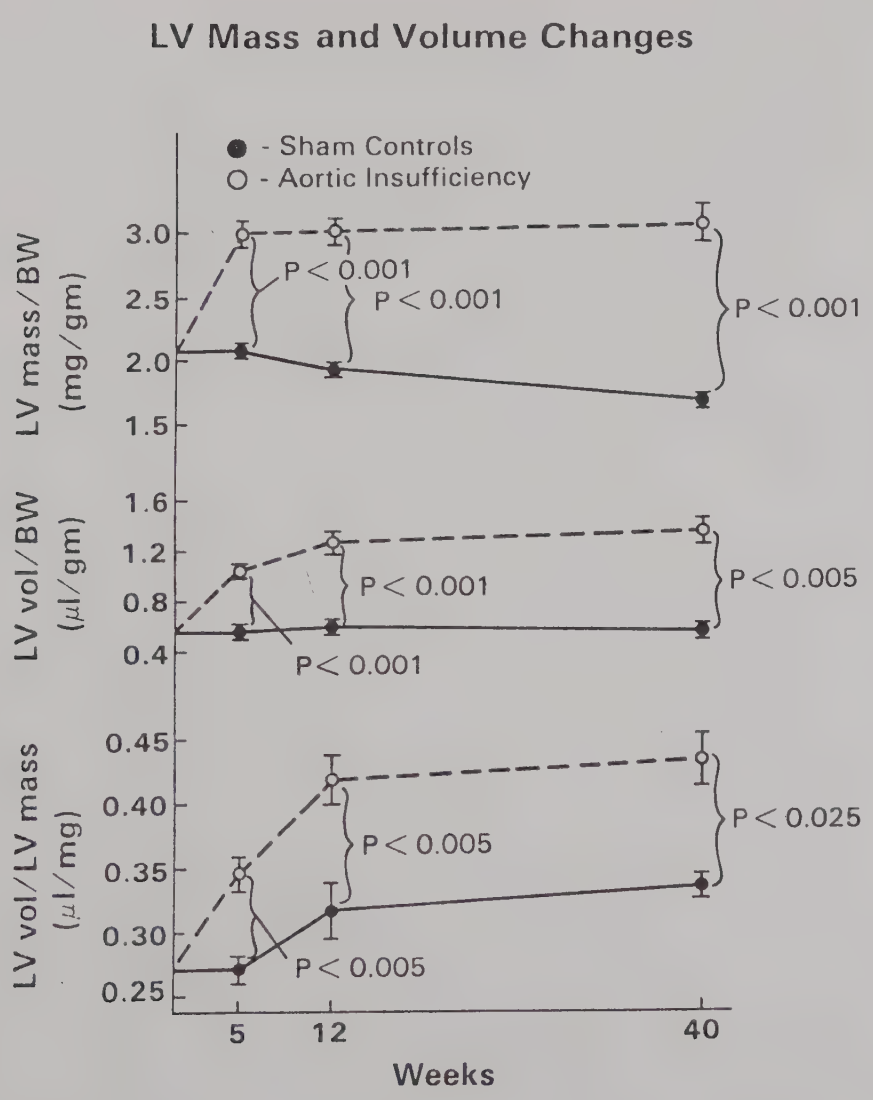

LV Mass and Volume Changes
● - Sham Controls
○ - Aortic Insufficiency
LV mass/BW (mg/gm)
3.0
2.5
2.0
1.5
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.001
LV vol/BW (μl/gm)
1.6
1.2
0.8
0.4
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.005
LV vol/LV mass (μl/mg)
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
P < 0.005
P < 0.005
P < 0.025
5
12
40
Weeks

FIG.24

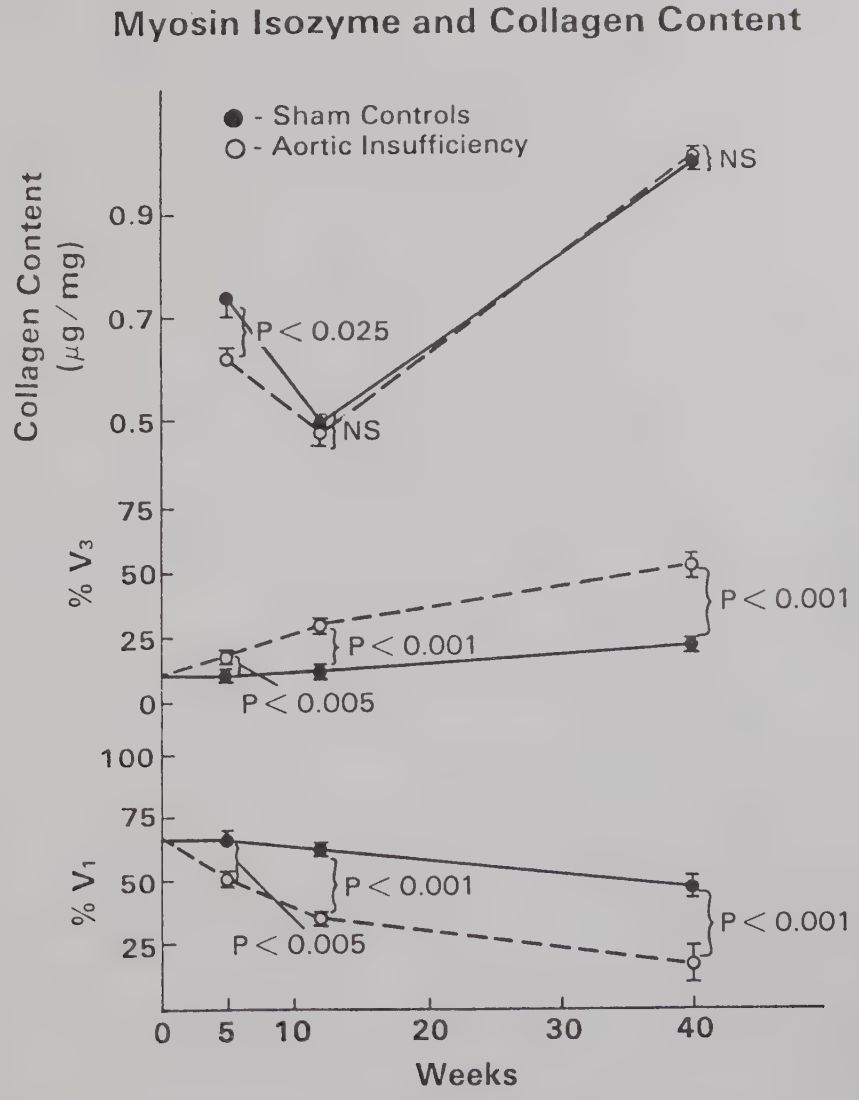

Myosin Isozyme and Collagen Content
● - Sham Controls
○ - Aortic Insufficiency
Collagen Content (μg/mg)
0.9
0.7
0.5
P < 0.025
NS
NS
% V3
75
50
25
0
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.005
% V1
100
75
50
25
P < 0.001
P < 0.005
P < 0.001
0
5
10
20
30
40
Weeks

FIG.25

L'hypertrophie compense la diminution de la force contractile (Fig. 25). A partir de la 10ème-13ème semaine (groupe 2), maxTA/s et maxdT/dt/s demeurent stables (Figs. 22 et 23) alors que $V_{max}$ et % $V_1$ continuent de diminuer. A la 40ème semaine, maxTA/s et maxdT/dt/s ne présentent plus de différences significatives entre IA et témoins. Cela est lié à l'augmentation de la section du muscle papillaire chez les témoins. D'autre part, $V_{max}$ et le % $V_1$ diminuent et le % $V_3$ augmente chez les témoins au cours de l'âge. La majeure partie des changements isozymiques de la myosine et de la vitesse maximale de raccourcissement induits par l'insuffisance aortique, surviennent dans les 10 à 13 premières semaines.

γ) Il existe une relation linéaire entre la vitesse maximale de raccourcissement et le pourcentage des isoenzymes $V_1$ et $V_3$.

Les variations de $V_{max}$ en fonction du % $V_3$ sont représentées sur la Figure 26.

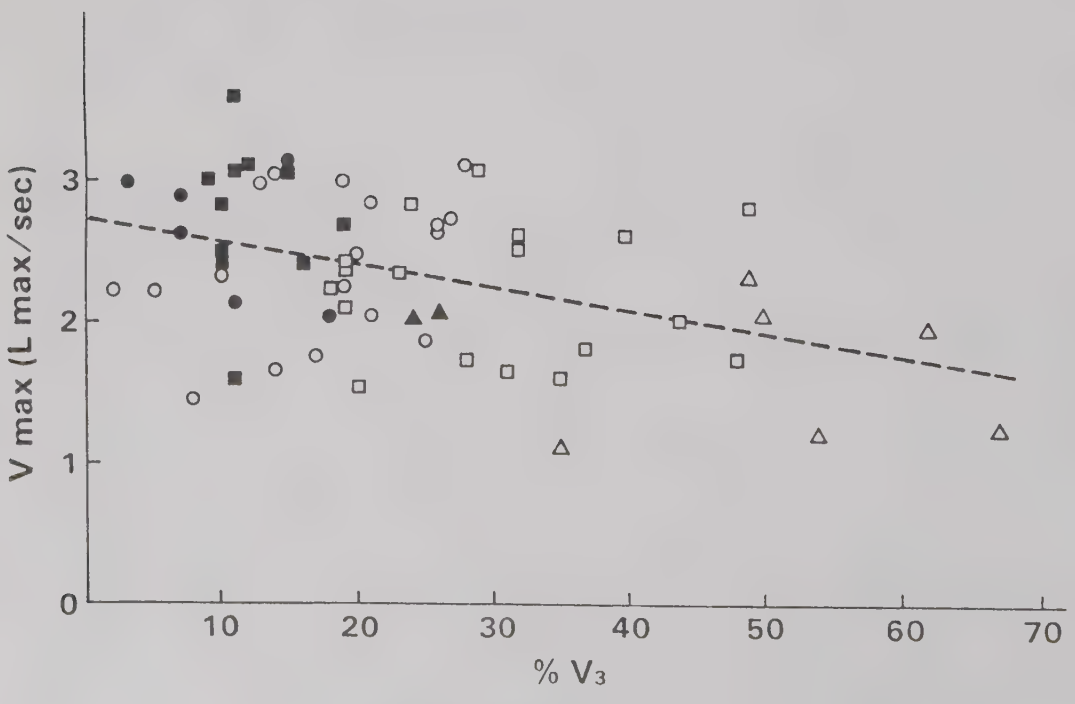



FIG.26

Il existe une linéarité comparable à celle observée par K. SCHWARTZ et coll (1982) après sténose de l'aorte abdominale.

δ) Ces résultats montrent que la vitesse maximale de raccourcissement est le paramètre mécanique le mieux corrélé aux pourcentages de $V_1$ et de $V_3$ aux différents stades de l'hypertrophie cardiaque induite par insuffisance aortique chez le rat. Les modifications significatives de la $V_{max}$ apparaissent relativement tôt (dès la 4ème-7ème semaine), parallèlement aux changements isozymiques de la myosine.

### d - Modifications précoces et simultanées des isozymes de la myosine et de la vitesse maximale de raccourcissement au cours de l'hypertrophie cardiaque

Une surcharge cardiaque a été induite chez le rat jeune, âgé de trois semaines par une sténose de l'aorte thoracique (SA). Trois groupes de rats comprenant chacun rats opérés et rats témoins ont été étudiés respectivement après une semaine de SA (groupe 1), un mois de SA (groupe 2) et deux mois de SA (groupe 3). Ce travail a été réalisé en collaboration avec L. BUGAISKY (groupe R. WHALEN, Institut Pasteur, Paris) et le groupe K. SCHWARTZ-B. SWYNGHEDAUW (Hôpital Lariboisière, Paris).

Après une semaine de sténose, le degré d'hypertrophie du ventricule gauche est de 53 % ; à un mois, il est de 82 % et à deux mois de 80 %. Un tel modèle de surcharge cardiaque est intéressant car le degré d'hypertrophie myocardique après seulement une semaine de sténose est important. Le tableau suivant résume les variations

de la vitesse maximale de raccourcissement et de l'isoenzyme $V_3$ de la myosine.

| | | $V_{max}$ | % $V_3$ |
|---|---|---|---|
| Groupe 1 | Témoins (n = 9) | 2,7 ± 0,2 | 0 |
| | SA (n = 8) | 1,9 ± 0,1 | 26 ± 2 |
| Groupe 2 | Témoins (n = 8) | 2,7 ± 0,1 | 8 ± 1 |
| | SA (n = 8) | 1,6 ± 0,1 | 41 ± 4 |
| Groupe 3 | Témoins (n = 9) | 2,8 ± 0,1 | 10 ± 1 |
| | SA (n = 8) | 1,7 ± 0,2 | 47 ± 8 |

Ce tableau montre qu'une part très importante de la baisse de la vitesse maximale de raccourcissement et de l'augmentation de % $V_3$ est atteinte après une semaine de sténose aortique. Cela montre la précocité des modifications biochimiques qui surviennent simultanément à la baisse de la vitesse maximale de contraction. Ici encore, le pourcentage de l'isoenzyme $V_3$ est fonction linéaire de la vitesse maximale de raccourcissement : $\% V_3 = -26,8 V_{max} + 83$ ($r = 0,73$). La pente de la droite de régression est similaire à celle observée par K. SCHWARTZ et coll (1982) au cours de sténose de l'aorte abdominale et après hypophysectomie.

Les résultats présentés dans ce paragraphe montrent que les modifications isozymiques de la myosine apparaissent (i) simultanément à celles de la vitesse maximale de raccourcissement, (ii) parfois très précocément, (iii) et sont liées selon une même relation linéaire indépendamment de l'étiologie (hypophysectomie, surcharge myocardique de pression ou de volume).

## C - La relaxation au cours de l'hypertrophie cardiaque

Depuis plusieurs années de nombreuses anomalies diastoliques ont cliniquement été décrites au cours de l'hypertrophie ventriculaire gauche : (S. STEWART et coll, 1968 ; J. SANDERSON et coll, 1977 et 1978 ; J. GOODWIN, 1980 ; P. HANRATH et coll, 1980 a et b ; Y. HIROTA, 1980 ; B. LORELL et coll, 1980). Chez l'animal, des anomalies de la contraction et de la relaxation observées au cours de l'hypertrophie myocardique ont été rapportées par W. PARMLEY et E. SONNENBLICK (1969), O. BING et coll (1971), B. HAMRELL et N. ALPERT (1977). La diversité de ces observations rend prématuré de dégager de façon simple les causes, mécanismes et conséquences des troubles diastoliques du coeur hypertrophié.

. Nous avons étudié la relaxation myocardique lors des surcharges hémodynamiques chez le rat. Les questions auxquelles nous nous sommes proposé de répondre sont les suivantes :

. les troubles de la relaxation précèdent-ils ou non les troubles de la contraction ?

. Sont-ils quantitativement importants ?

. La "sensibilité à la charge" de la phase de relaxation est-elle ou non modifiée par l'hypertrophie myocardique ?

### 1) Chronologie des troubles mécaniques de la contraction et de la relaxation au cours de l'hypertrophie myocardique du rat

a - La précession des troubles de la relaxation sur ceux de la contraction se pose d'autant que J. GOODWIN (1981) a discuté cette chronologie. Nous avons

suivi l'évolution de quatre paramètres mécaniques. Deux sont calculés pendant la contraction avec précharge seule : le maximum de vitesse de contraction (maxVc) et le maximum de vitesse de relaxation (maxVr). Les deux autres sont calculés pendant la contraction isométrique : le maximum de la dérivée par rapport au temps de la tension/$mm^2$ durant la phase de contraction (+maxdT/dt/$mm^2$) et le maximum de la dérivée par rapport au temps de la tension/$mm^2$ durant la phase de relaxation (-maxdT/dt/$mm^2$). Un moyen simple d'apprécier simultanément l'évolution de la contraction et de la relaxation au cours du développement de l'hypertrophie cardiaque consiste à suivre les rapports $R_1$ = maxVc/maxVr et $R_2$ = (+maxdT.$dt^{-1}$/-maxdT.$dt^{-1}$). La Figure 27 montre que $R_1$ et $R_2$ ne varient pas chez le rat adulte. De plus, après insuffisance aortique, $R_1$ et $R_2$ ne diffèrent pas significativement des valeurs contrôles.

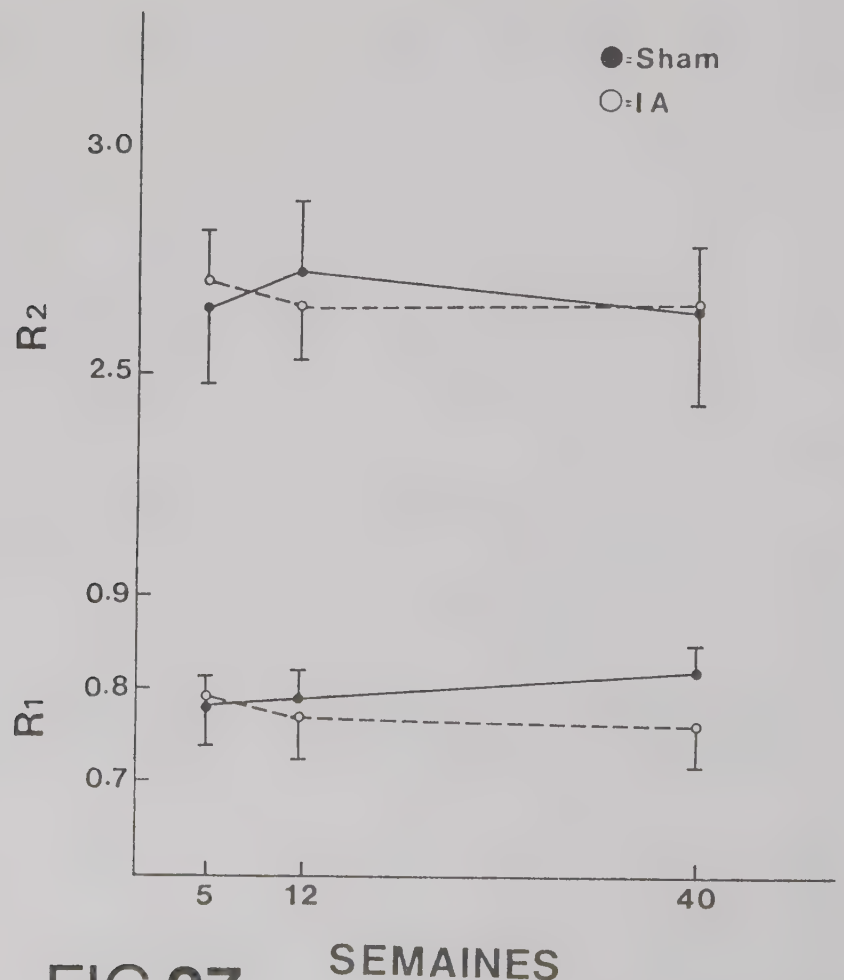



FIG.27

Cependant, nous avons vu plus haut, au paragraphe III.C.3 (et Figs 22 et 23) que $V_{max}$ et +maxdT/dt/mm$^2$ diminuaient au cours de l'insuffisance aortique, étudiées sur les mêmes groupes d'animaux. Le rapport $R_1$ demeure constant ($\simeq 0,80$) au cours d'autres types de surcharge myocardique induite après fistule aorto-cave, sténose de l'aorte et sténose de l'aorte associée à une insuffisance aortique (Y. LECARPENTIER et coll, 1982). On observe donc une diminution proportionnellement égale des vitesse de contraction et de relaxation, d'une part au cours de la contraction isotonique avec précharge seule, d'autre part au cours de la contraction isométrique, de sorte que les coefficients $R_1$ et $R_2$ restent constants, indépendamment du type et/ou du degré de la surcharge myocardique. L'absence de modifications significatives de $R_1$ et de $R_2$ après surcharges hémodynamiques chroniques montrent que les deux couples de paramètres maxVc et maxVr d'une part, et de +maxdT.dt$^{-1}$/mm$^2$ et -maxdT.dt$^{-1}$/mm$^2$ d'autre part, subissent des variations parallèles dans le temps et proportionnellement égales, quels que soient le degré et le stade de l'hypertrophie myocardique.

b - Les coefficients $R_1$ et $R_2$ chez le rat nouveau-né.

Nous avons étudié les coefficients $R_1$ et $R_2$ dans 14 fragments myocardiques de rat nouveau-né :

$R_1 = 1,5 \pm 0,1$ et $R_2 = 2,1 \pm 0,1$.

Le changement majeur se situe au niveau de $R_1$. En effet, le coefficient $R_1$ est égal à 1,5 à la naissance et diminue de 80 % en l'espace de un mois, devenant alors égal à 0,84. A la naissance la vitesse de relaxation est beaucoup plus lente que la vitesse de contraction lors-

que la charge est égale à la précharge ; ceci s'inverse progressivement en 3 à 4 semaines, la vitesse de relaxation devenant plus grande que la vitesse de raccourcissement. A. FABIATO et F. FABIATO (1978) ont montré que le réticulum sarcoplasmique était non fonctionnel à la naissance et parvenait à maturité fonctionnelle vers la 3ème-4ème semaine post-partum. D'autre part, nous avons montré au chapitre I le rôle du réticulum sarcoplasmique sur les cinétiques de relaxation des sarcomères et du muscle entier, particulièrement à faible charge. Cela suggère, conjointement à la diminution du rapport $R_1$ entre la naissance et la 4ème semaine, que les capacités de recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique deviennent optimales vers la 4ème semaine.

c - Augmentation du coefficient $R_1$ après hypoxie myocardique.

L'ensemble des paramètres mesurant la performance contractile est diminué après hypoxie myocardique. Nous avons montré que la vitesse de relaxation diminuait proportionnellement plus que la vitesse de raccourcissement après substitution du gaz $O_2$ 95 % - $CO_2$ 5 % par $N_2$ 95 % - $CO_2$ 5 % pendant 20 à 30 minutes (Y. LECARPENTIER, 1982). Cela correspond à une augmentation (reversible) du coefficient $R_1$.

d - Le coefficient $R_1$ est fonction linéaire du coefficient A.isot/A.isom.

Nous avons vu plus haut que A.isot/A.isom quantifiait la "sensibilité de la relaxation" aux variations de la charge. La Figure 28 montre la relation linéaire entre $R_1$ et A.isot/A.isom dans trois groupes de rats à différents âges : rats nouveau-nés, rats âgés de 1 mois et rats adultes. Il faut noter aussi que le coefficient

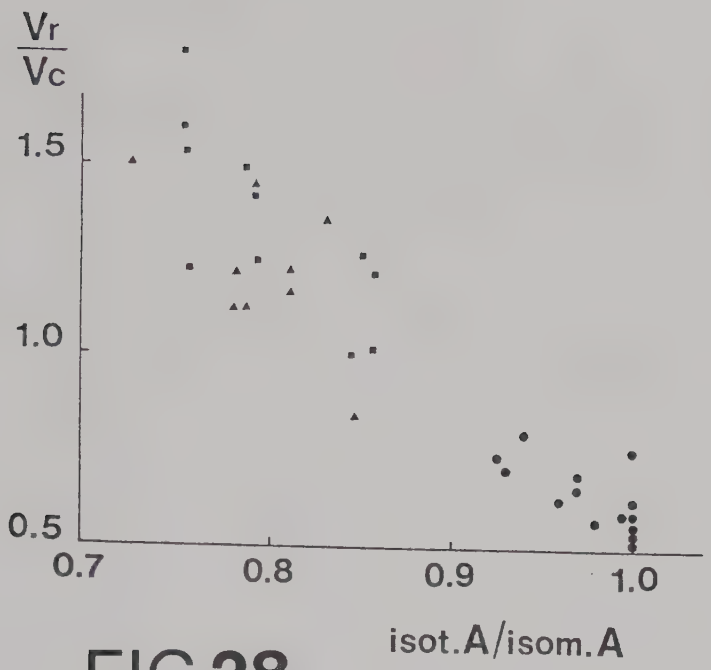

Vr
Vc
1.5
1.0
0.5
0.7
0.8
0.9
1.0
isot.A/isom.A

FIG.28

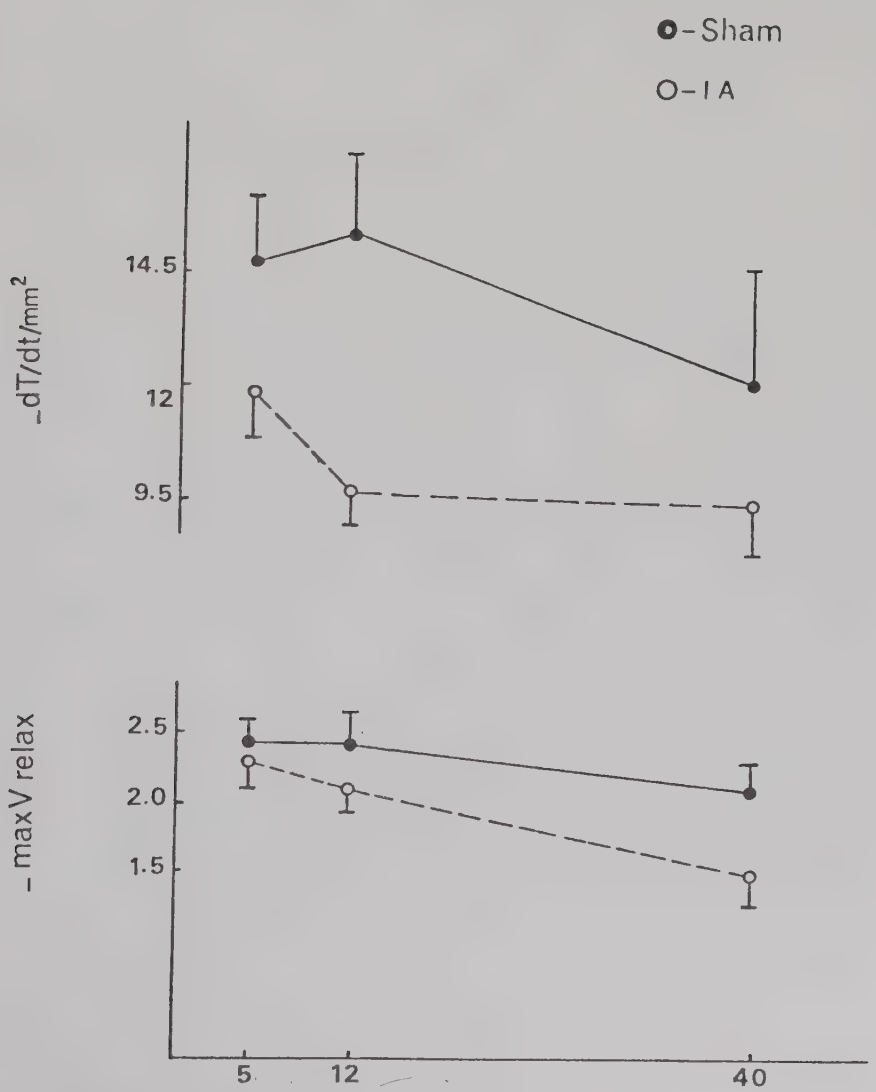

●-Sham
O-IA
-dT/dt/mm²
14.5
12
9.5
-maxV relax
2.5
2.0
1.5
5
12
40
SEMAINES

FIG.29

$R_1$ augmente et devient supérieur à 1 après caféine (Y. LECARPENTIER et coll, 1979). Ainsi, le rapport $R_1$ entre vitesse de raccourcissement et vitesse de relaxation n'est pas constant et augmente au cours du développement post-natal. De plus, il s'inverse par rapport à la valeur observée chez le rat adulte et devient de type néo-natal après hypoxie myocardique. L'absence de modifications significatives de $R_1$ après surcharge de pression et/ou de volume suggère que les variations des cinétiques de libération et de recaptage du calcium par les sites de séquestration intracellulaires surviennent de façon relativement synchrone. Cela est renforcé par l'absence de modifications des paramètres testant la sensibilité de la relaxation à la charge, que nous verrons plus bas au paragraphe III.C.3.

2) Altérations des paramètres mécaniques de relaxation lors de l'hypertrophie cardiaque chez le rat

Les paramètres de relaxation -maxVr et -maxdT/dt/mm$^2$ sont diminués de façon statistiquement significative par rapport aux valeurs témoins au cours des fistules aorto-caves, des sténoses de l'aorte abdominale et de l'association sténose de l'aorte et insuffisance aortique (Y. LECARPENTIER et coll, 1982). Il s'agit dans cette étude de surcharges hémodynamiques de longue durée d'environ douze mois. Après une insuffisance aortique de durée relativement plus courte (4 à 7 semaines et 10 à 13 semaines), la vitesse maximale de relaxation (-maxVr) est diminuée mais de façon non significative par rapport aux témoins. Les deux paramètres -maxVr et -maxdT/dt/mm$^2$ sont présentés sur la Figure 29. La baisse de -maxdT/dt/mm$^2$

est essentiellement liée à l'augmentation de la section des muscles. Les paramètres mécaniques classiques de relaxation sont altérés en fonction du type et de la durée de la surcharge chronique.

3) La "sensibilité de la relaxation aux variations de la charge" au cours de l'hypertrophie cardiaque

Cette propriété a été traitée en détail dans les deux articles : "Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure" par Y. LECARPENTIER et coll (1982) et "La relaxation cardiaque au cours de l'hypertrophie myocardique chronique expérimentale : le rôle du réticulum sarcoplasmique" par Y. LECARPENTIER et coll (1983). Ces études montrent que la "sensibilité à la charge" de la phase de relaxation, quantifiée par les rapports A.isot/A.isom et tRi (voir Fig. 16), ne subit aucune modifications quels que soient le type ou la durée des surcharges myocardiques chroniques. A l'inverse, l'hypoxie diminue, voire fait disparaître reversiblement la sensibilité de la relaxation aux variations de la charge (L. CHUCK et coll, 1981 ; Y. LECARPENTIER et coll, 1982). L'hypoxie a donc des effets sur la sensibilité à la charge que l'on n'observe pas lors de l'hypertrophie cardiaque même au stade d'insuffisance cardiaque congestive. L'interprétation de ce phénomène n'est pas aisée d'autant que de nombreuses anomalies du recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique ont été décrites au cours de l'hypertrophie cardiaque (N. DHALLA et coll, 1978 ; E. GERTZ et coll, 1967 ; R. LENTZ et coll, 1978 ; A. SCHWARTZ et coll, 1973 ; L. SORDAHL et coll, 1973 ; Y. ITO et coll, 1974). Ces travaux rapportent généralement une diminution de l'"uptake", du "binding" et

de l'activité $Ca^{2+}$-ATPasique du réticulum sarcoplasmique. Par ailleurs, E. PAGE et L. Mc CALLISTER (1973) ont montré que l'hypertrophie des myocytes, après constriction de l'aorte chez le rat, s'accompagne d'une augmentation de la surface absolue des membranes sarcotubulaires et de la surface sarcotubulaire par unité de volume cellulaire. Par contre, la surface des membranes sarcotubulaires par unité de volume myofibrillaire demeure constante. Cela peut contribuer à expliquer que les indices A.isot/A.isom et tRi demeurent constants après surcharges chroniques. La régulation de la "sensibilité de la relaxation aux variations de charge" qui suppose la présence d'un réticulum sarcoplasmique efficace n'est pas perturbée après surcharges chroniques de pression et/ou de volume chez le rat, contrairement à ce qui est observé après hypoxie.

# CONCLUSION

Cette étude sur la mécanique du muscle strié cardiaque et squelettique fait ressortir deux ordres d'idée. D'une part, les propriétés mécaniques de base caractérisant respectivement les phases de contraction et de relaxation observées à l'échelon du muscle entier se retrouvent à l'échelon du sarcomère. D'autre part, après une surcharge hémodynamique chronique, certains mécanismes d'adaptation tendent à compenser dans le tissu myocardique les effets de cette surcharge ; les modifications du profil isozymique de la myosine, corrélées aux modifications de la vitesse maximale de raccourcissement pourraient constituer l'un de ces mécanismes d'adaptation.

Le sarcomère constitue l'unité élémentaire du tissu musculaire strié tant sur le plan ultrastructural que sur le plan mécanique. A. M. GORDON, A. F. HUXLEY et F. J. JULIAN (1966) ont les premiers fait apparaître les fondements ultrastructuraux de la loi de Starling (Fig. 1) à partir de muscle squelettique, en conditions isométriques. Notre technique d'étude des sarcomères par diffraction laser permet de mesurer en temps réel les cinétiques des sarcomères pour tous les niveaux de charge entre la charge "nulle" et la charge "isométrique". Cela élargit donc le champ de connaissances des propriétés mécaniques des sarcomères qui ont essentiellement été étudiées

sur des muscles en contraction isométrique ce qui représente un mode particulier de fonctionnement. La longueur des sarcomères présente un certain degré de dispersion au repos qui n'augmente pas de façon significative lors de la phase de contraction. Cela témoigne d'un assez haut synchronisme et donc d'une unité des mouvements de l'ensemble des sarcomères situés dans le champ éclairé par le laser. Nous avons montré qu'il existait pour un niveau donné de la charge une correspondance biunivoque indépendante du temps entre la vitesse de raccourcissement des sarcomères et leur raccourcissement. Cette propriété est également vraie au niveau du muscle squelettique entier. Cette propriété est à la base de la construction du diagramme tridimensionnel Force-Vitesse-Longueur caractérisant le niveau de contractilité d'un muscle. Ainsi, une relation biunivoque entre vitesse et raccourcissement existe similairement au niveau du sarcomère et au niveau du muscle entier. En outre, cette même relation est observée dans le muscle squelettique et dans le tissu myocardique. Cela met en évidence l'unité mécanique existant entre les muscles striés cardiaque et squelettique. Il est alors possible de construire la relation tridimensionnelle Vitesse du sarcomère-Raccourcissement du sarcomère en fonction de la force du muscle. La vitesse maximale de raccourcissement des sarcomères à charge nulle est une valeur particulière de cette relation tridimensionnelle caractérisant leur niveau de contractilité. De plus, l'erreur sur la mesure de la vitesse de raccourcissement des sarcomères est inférieure à celle faite sur la vitesse de raccourcissement du muscle entier parce qu'il est difficile d'apprécier avec exactitude la proportion de tissu ayant subi

des dommages au niveau des clips et ne faisant plus parti du tissu contractile proprement dit alors que la précision sur la mesure de la longueur des sarcomères est de 200 Å. Nous avons élaboré un modèle théorique de la contractilité musculaire, basé sur le fait que le nombre de ponts actine-myosine capables de se former était lié au degré de chevauchement des filaments fins et épais. La condition nécessaire et suffisante pour que la relation bijective indépendante du temps entre la vitesse et le raccourcissement des éléments contractiles soit vérifiée par le système d'équation est que, pour une charge donnée, un degré déterminé de raccourcissement corresponde à un et un seul niveau d'activation ; or, une amplitude donnée de raccourcissement des éléments contractiles survient à des instants différents, ce qui confère à la relation bijective vitesse-raccourcissement sa propriété d'indépendance du temps. L'activation demeure donc constante durant la partie de la phase de raccourcissement où l'on observe la correspondance biunivoque entre vitesse et raccourcissement. Ce modèle rend compte du fait que le maximum de force des éléments contractiles précède nettement leur maximum de raccourcissement et soit sensiblement contemporain du maximum de vitesse de mise en tension isométrique. Cela pourrait aider à interpréter la précession du pic de luminescence de l'aequorine par rapport au pic de tension isométrique observé par les auteurs utilisant l'aequorine comme "marqueur" intracellulaire du calcium. Ce modèle rend aussi compte du fait que la vitesse maximale de raccourcissement du muscle est indépendante de sa longueur initiale pour des valeurs comprises entre $L_{max}$ et environ -10 % de $L_{max}$.

Nous avons étudié la relaxation du muscle et des sarcomères. Deux phases successives composent la relaxation des sarcomères, l'une rapide, suivie par une phase plus lente. L'importance relative de l'une et de l'autre dépend du niveau de la charge totale. A faible charge la phase rapide prédomine, à charge élevée, la phase lente prédomine. La survenue de la phase rapide dépend des conditions de charge et est dite "sensible à la charge". La sensibilité de la phase de relaxation à la charge suppose la présence d'un réticulum efficace . Celle-ci disparait ou est très faible dans les myocardes de lapin foetus et de rat nouveau-né dont le réticulum sarcoplasmique n'est pas encore fonctionnel. Ce comportement mécanique de la relaxation des sarcomères est compatible avec l'hypothèse d'une régulation de l'affinité de la troponine C pour le calcium par la charge ou/et le raccourcissement. A forte charge, l'affinité de la troponine C pour le calcium augmenterait, à faible charge, elle diminuerait. Mais aucun argument expérimental direct ne peut encore confirmer cette hypothèse.

Différentes surcharges hémodynamiques de pression et/ou de volume chez le rat ont induit une hypertrophie myocardique. Les propriétés contractiles du tissu cardiaque sont modifiées selon le type et la durée des surcharges chroniques. Bien que la plupart des paramètres de contractilité soit modifiée au cours de l'hypertrophie cardiaque expérimentale chez le rat, on observe cependant encore la relation bijective entre la vitesse et le raccourcissement. Pour un degré de raccourcissement donné, la vitesse de raccourcissement est plus faible, dans le myocarde hypertrophié que dans le myocarde normal. Cela implique que l'équilibre entre activation et inactivation

demeure durant la partie indépendante du temps de la relation vitesse-raccourcissement.

Il faut souligner que la relaxation est perturbée au cours de l'hypertrophie myocardique chez le rat comme en témoignent la baisse de la vitesse maximale de relaxation et celle du pic de la dérivée négative de la tension/$mm^2$. Cependant nous avons observé que la "sensibilité de la relaxation à la charge" n'était pas modifiée, même au stade de défaillance cardiaque congestive, alors que l'hypoxie supprime reversiblement cette propriété. D'autre part, les perturbations mécaniques de la relaxation ne précèdent chronologiquement pas les modifications de la contraction, même après une hypertrophie rapide et importante induite après sténose de l'aorte thoracique chez le rat jeune.

Les changements isozymiques de la myosine après surcharge hémodynamique chez le rat se traduisent par une inversion du profil isozymique avec une diminution de la forme $V_1$ et une augmentation de la forme $V_3$, la première ayant une activité ATPasique plus élevée que la seconde. Dans les différents types de surcharge, il existe une relation linéaire directe entre le pourcentage de $V_1$ et la vitesse maximale de raccourcissement, et inverse entre % $V_3$ et $V_{max}$. Les changements isozymiques de la myosine ne précédent pas chronologiquement la diminution de la vitesse maximale de contraction. Les modifications biochimiques, corrélées avec la baisse de la $V_{max}$, pourraient représenter un processus d'adaptation du tissu myocardique face à une situation nouvelle de surcharge hémodynamique, plutôt qu'un processus pathologique. Une économie relative d'énergie est réalisée par le muscle

hypertrophié en utilisant un système enzymatique ATPasique plus lent, permettant d'effectuer un travail donné plus lentement qu'il ne le ferait en l'absence de surcharge chronique.

L'ensemble de cette étude faite en collaboration avec des ingénieurs spécialistes des lasers et des biochimistes du tissu myocardique contribue à mieux connaître les processus mécaniques de la contraction et de la relaxation cardiaques et leurs relations avec certains mécanismes biochimiques intracellulaires. Le nombre élevé de patients souffrant d'affections cardio-vasculaires doit encourager tout effort ayant pout but de mieux les comprendre et de mieux les soigner. Nous souhaiterions ultérieurement étudier le mécanisme de la régulation allostérique de la contraction cardiaque et tout particulièrement la troponine C et ses changements conformationnels induits par la fixation du calcium grâce à certaines techniques de spectroscopie laser.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ABOTT, B. C. and MOMMAERTS, W. F. H. - A study of inotropic mechanisms in the papillary muscle preparation. J. Gen. Physiol., 1959, 42 : 533-551.

2. ALLEN, D. G. and KURIHARA, S. - The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J. Physiol. (Lond.) 1982, 327 : 79-94.

3. ALPERT, N. R., GALE, H. H. and TAYLOR, N. - "Factors Influencing Myocardial Contractility". Tanz, R. D., Kavaler, F. and Roberts, J. (eds), Academic Press, New-York-London, 1966, pp. 127-133.

4. BÁRÁNY, M. - ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle-shortening. J. Gen. Physiol., 1967, 50 : 197-218.

5. BASKIN, R. J., ROOS, K. P. and YEH, Y. - Light diffraction study of single skeletal muscle fibers. Biophys. J., 1979, 28 : 45-64.

6. BEZNÁK, M. - Haemodynamic changes in hypophysectomised rat. Circ. Res., 1959, 7 : 907-916.

7. BING, O. H. L., MATSUSHITA, S., FANBURG, B. L. and LEVINE, H. J. - Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. Circ. Res., 1971, 28 : 234-245.

8. BLIX, M. - Die Länge und die Spannung des Muskels. Skand. Arch. Physiol., 1892, 3 : 295-318.

9. BREMEL, R. D., MURRAY, J. M. and WEBER, A. - Manifestations of cooperative behavior in the regulated actin filament during actin-activated ATP hydrolysis in the presence of calcium. In : Symposia on Quantitative Biology, Gordon, J. (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New-York, 1972, 37 : 267-275.

10. BREMEL, R. D. and WEBER, A.-M. - Cooperation within Actin Filament in Vertebrate Skeletal Muscle. Nature New Biol., 1972, 238 : 97-101.

11. BRUTSAERT, D. L. and SONNENBLICK, E. H. - Force-velocity-length-time relations of the contractile elements in heart muscle of the cat. Circ. Res., 1969, 24 : 137-149.

12. BRUTSAERT, D. L. and SONNENBLICK, E. H. - The early onset of maximum velocity of shortening in heart muscle of the cat. Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol., 1971 a, 324 : 91-99.

13. BRUTSAERT, D. L. and SONNENBLICK, E. H. - Nature of the force-velocity relation in heart muscle. Cardiovasc. Res., 1971 b, 5 (suppl. 1) : 18-33.

14. BRUTSAERT, D. L., CLAES, V. and SONNENBLICK, E. H. - Effects of abrupt load alterations on force-velocity-length and time relations during isotonic contractions of heart muscle : load clamping. J. Physiol. (Lond.), 1971 a, 216 : 319-330.

15. BRUTSAERT, D. L., CLAES, V. A. and SONNENBLICK, E. H. - Velocity of shortening of unloaded heart muscle and the length-tension relation. Circ. Res., 1971 b, 29 : 63-75.

16. BRUTSAERT, D. L. and CLAES, V. A. - Onset of mechanical activation of mammalian heart muscle in calcium and strontium containing media. Circ. Res., 1974 a, 35 : 345-357.

17. BRUTSAERT, D. L. - The force-velocity-length-time interrelation of cardiac muscle. In : The Physiological Basis of Starling's Law of the Heart. Ciba Foundation Symposium. Elsevier-Excerpta Medica, North-Holland, 1974 b, pp. 156-175.

18. BRUTSAERT, D. L., CLAES, V. A. and de CLERCK, N. M. - Relaxation of mammalian single cardiac cells after pretreatment with the detergent Brij-58. J. Physiol. (Lond.), 1978a, 283 : 481-491.

19. BRUTSAERT, D. L., De CLERCK, N. M., GOETHALS, M. A. and HOUSMANS, P. R. - Relaxation of ventricular cardiac muscle. J. Physiol. (Lond.), 1978 b, 283 : 469-480.

20. BRUTSAERT, D. L., HOUSMANS, P. R. and GOETHALS, M. A. - Dual control of relaxation : its role in the ventricular function in the mammalian heart. Circ. Res., 1980, 47 : 637-652.

21. BUCHTHAL, F. and KNAPPEIS, G. G. - Diffraction spectra and minute structure of the cross-striated muscle fibre. Skand. Arch. Physiol., 1940, 83 : 281-307.

22. CHUCK, L. H., GOETHALS, M. A., PARMLEY, W. W. and BRUTSAERT, D. L. - Load-insensitive relaxation caused by hypoxia in mammalian cardiac muscle. Circ. Res., 1981, 48 : 797-803.

23. CLEWORTH, D. R. and EDMAN, K. A. P. - Laser diffraction studies on single skeletal muscle fibers. Science, 1969, 163 : 296-298.

24. CLEWORTH, D. R. and EDMAN, K. A. P. - Changes in sarcomere length during isometric tension development in frog skeletal muscle. J. Physiol. (Lond.), 1972, 227 : 1-17.

25. DELAY, M. J., ISHIDE, N., JACOBSON, R. C., POLLACK, G. H. and TIROSH, R. - Stepwise sarcomere shortening : analysis by high-speed cinemicrography. Science, 1981, 213 : 1523-1525.

26. DELCAYRE, C., SWYNGHEDAUW, B. - A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. Pflügers Arch., 1975, 355 : 39-47.

27. DHALLA, N. S., DAS, P. K. and SHARMA, G. P. - Subcellular basis of cardiac contractile failure. J. Mol. Cell. Cardiol., 1978, 10 : 363-385.

28. ENDO, M. - Length dependence of activation of skinned muscle fibres by calcium. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1973, 37 : 505-510.

29. FABIATO, A. and FABIATO, F. - Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J. Physiol. (Lond.), 1975, 249 : 469-495.

30. FABIATO, A. and FABIATO, F. - Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Circ. Res., 1977, 40 : 119-129.

31. FABIATO, A. and FABIATO, F. - Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and newborn rat ventricles. Ann. NY Acad. Sci., 1978, 507 : 491-522.

32. FABIATO, A. and FABIATO, F. - Excitation-contraction-coupling of isolated cardiad fibers with disrupted or closed sarcolemmas calcium-dependent cyclic and tonic contraction. Circ. Res., 1972, 31 : 293-307.

33. FORD, L. E. and FORMAN, R. - Tetanized cardiac muscle. In : The Physiological Basis of Starling's Law of the Heart. Ciba Foundation Symposium. Elsevier-Excerpta Medica, North-Holland, 1974, pp. 137-150.

34. FRANK, O. - Zur Dynamik des Herzmuskels. Z. Biol., 1895, 32 : 370-447.

35. FUCHS, F. - On the relation between filament overlap and the number of calcium-binding sites on glycerinated muscle fibers. Biophys. J., 1978, 21 : 273-277.

36. FUJIME, S.-Optical diffraction study of muscle fibers. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 379 : 227-238.

37. GERTZ, E. W., HESS, M. L., LAIN, R. F. and BRIGGS, F. N. - Activity of vesicular calcium pump in the spontaneously failing heart-lung preparation. Circ. Res., 1967, 20 : 477-484.

38. GOLDSPINK, G., LARSON, R. E. and DAVIES, R. E. - Fluctuations in sarcomere length in the chick anterior and posterior latissimus dorsi muscle during isometric contraction. Experientia, 1970, 26 : 16-18.

39. GOODWIN, J. F. - Hypertrophie cardiomyopathy : a disease in search of its own identity. Am. J. Cardiol., 1980, 45 : 177- 180.

40. GORDON, A. M., HUXLEY, A. F. and JULIAN, F. J. - The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. J. Physiol. (Lond.), 1966, 184 : 170-192.

41. HAMRELL, B. B. and ALPERT, N. R. - The mechanical characteristics of hypertrophied rabbit cardiac muscle in the absence of congestive heart failure. Circ. Res., 1977, 40 : 20-25.

42. HANRATH, P., MATHEY, D. G., KREMER, P., SONNTAG, F. et BLEIFELD, W. - Effect of verapamil on left ventricular isovolumic relaxation time and regional left ventricular filling in hypertrophic cardiomyopathy. Am. J. Cardiol., 1980, 45 : 1258-1264.

43. HANRATH, P., MATHEY, D. G., SIEGERT, R. and BLEIFELD, W. - Left ventricular relaxation and filling pattern in different forms of left ventricular hypertrophy : an echocardiographic study. Am. J. Cardiol., 1980, 45 : 15- 23.

44. HARVEY, W. - Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus Translated. Franklin, K. J. (ed), Blackwell, Oxford, 1957, p. 104.

45. HATT, P. Y., JOUANNOT, P., MORAVEC, J. and SWYNGHEDAUW, B. - Current trends in heart hypertrophy. Basic Res. Cardiol., 1974, 69 : 479-483.

46. HATT, P. Y. - Cellular changes and damages in mechanically overloaded hearts. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, Vol. : 6 : Pathophysiology and Morphology of Myocardial Cell Alteration. Fleckenstein, A. and Rona, G., Univ. Park Press, Baltimore, 1975, pp. 325-333.

47. HATT, P. Y. - Notions actuelles sur l'hypertrophie cardiaque. Rencontre biologique, 1977a.Expansion Scientifique, Paris, pp. 105-113.

48. HATT, P. Y. - Cellular changes in mechanically overloaded heart. Basic Res. Cardiol., 1977 b, 72 : 198-202.

49. HATT, P. Y., JOUANNOT, P. and MORAVEC, J. - Le ventricule gauche aux différentes étapes d'une double surcharge mécanique. Etude au microscope électronique chez le rat. Pathol. Biol., 1979 a, 27 : 67-77.

50. HATT, P. Y., RAKUSAN, K., GASTINEAU, P. and LAPLACE, M. - Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-caval fistula in the rat). J. Mol. Cell. Cardiol., 1979 b, 2 : 989-998.

51. HENDERSON, A. H., FORMAN, R., BRUTSAERT, D. L. and SONNENBLICK, E. H. - Tetanic contraction in mammalian cardiac muscle. Cardiovasc. Res., 1971, 5 (suppl. 1) : 96-100.

52. HILL, A. V. - Abrupt transition from rest to activity in muscle. Proc. R. Soc. Lond., 1949, B 136 : 399-420.

53. HILL, A. V. - Trails and Trials in Physiology, Arnold, London, 1965, p. 135.

54. HIROTA, Y. - A clinical study of left ventricular relaxation. Circulation, 1980, 62 : 756-763.

55. HJALMARSON, A. C., WHITFIELD, C. H. and MORGAN, H. E. - Hormonal control of heart function and myosin ATPase activity. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 41 : 1584-1589.

56. HOERTER, J. A., MAZET, F. and VASSORT, G. - Perinatal growth of the rabbit cardiac cell : possible implications for the mechanism of relaxation. J. Mol. Cell. Cardiol., 1981, 13 : 725-740.

57. HOERTER, J. and LECARPENTIER, Y. - Load sensitivity of relaxation in the fetal and newborn rabbit heart. Cardiovasc. Res., 1983 (sous presse).

58. HOH, J. F. Y., McGRATH, P. A. and HALE, P. T. - Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin : effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. J. Mol. Cell. Cardiol., 1977, 10 : 1053-1076.

59. HOUSMANS, P. R., LEE, N. K. M. and BLINKS, J. R. - Active shortening retards the decline of the intracellular calcium transient in mammalian heart muscle. Science, 1983 (sous presse).

60. ITO, Y., SUKO, J. and CHIDSEY, C. A. - Intracellular calcium and myocardial contractility. V. Calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit herats. J. Mol. Cell. Cardiol., 1974, 6 : 237-247.

61. JEWELL, B. R. - A reexamination of the influence of muscle length on myocardial performance. Circ. Res., 1977, 40 : 221-230.

62. KAWAI, M. and KUNTZ, I. D. - Optical diffraction studies of muscle fibers. Biophys. J., 1973, 13 : 857-876.

63. KEURS ter, H. E. D. J., RIJNSBURGER, W. H., HEUNINGEN, R. van and NAGELSMIT, M. J. - Tension development and sarcomere length in rat cardiac trabeculae. Circ. Res., 1980, 46 : 703-714.

64. KORECKY, B. and BEZNÁK, B. - Effect of thyroxine on growth and function of cardiac muscle. In : Cardiac Hypertrophy. Alpert, N. R. (ed)., Academic Press, New York, 1971, pp. 55-64.

65. KRUEGER, J. W. and POLLACK, G. H. - Myocardial sarcomere dynamics during isometric contraction. J. Physiol. (Lond.), 1975, 251 : 627-643.

66. KRUEGER, J. W. and STROBECK, J. E. - Sarcomere relaxation in intact cardiac muscle. Eur. J. Cardiol., 1978, 7 (suppl.) : 79-96.

67. KRUEGER, J. W. and FARBER, S. - Sarcomere length "orders" relaxation in cardiac muscle. Eur. Heart J., 1980a, 1 (suppl. A) : 37-47.

68. KRUEGER, J. W., FORLETTI, D. and WITTENBERG, B. A. - Uniform sarcomere shortening behavior in isolated cardiac muscle cells. J. Gen. Physiol., 1980 b, 76 : 587-607.

69. LECARPENTIER, Y. C., CHUCK, L. H. S., HOUSMANS, P. R., de CLERCK, N. M. and BRUTSAERT, D. L. - Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle.Am. J. Physiol., 1979, 237 : H455-H460.

70. LECARPENTIER, Y., MARTIN, J. L., GASTINEAU, P. and HATT, P. Y. - Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure. Am. J. Physiol., 1982, 242 : H855-H861.

71. LECARPENTIER, Y., MARTIN, J. L., GASTINEAU, P. and HATT, P.Y. - Force-velocity-length relationship during cardiac hypertrophy. In : Advances in Myocardiology, vol. 4. Chazov, E., SAKS, V. and Rona, G. (eds), Plenum publishing Corporation, New York, 1983 a, pp. 87-95.

72. LECARPENTIER, Y., MARTIN, J. L., GRILLON, G., ANTONETTI, A. and HATT, P. Y. - Apport du laser à l'étude de la mécanique cardiaque. La Nouvelle Presse Méd., 1983 b (sous presse).

73. LENTZ, R. W., HARRISON, C. E., Jr., DEWEY, J. D., BARNHORST, D. A., DANIELSON, G. K. and PLUTH, J. R. - Functional evaluation of cardiac sarcoplasmic reticulum and mitochondria in human pathologic states. J. Mol. Cell. Cardiol., 1978, 10 : 3-30.

74. LIFSCHITZ, M. D. and KAYNE, H. L. - Cardiac myofibrillar ATPase activity in hypophysectomized or thyroidectomized rats. Biochem. Pharmacol., 1966, 15 : 405-407.

75. LOMPRE, A-M., SCHWARTZ, K., D'ALBIS, A., LACOMBE, G., THIEM, N. V. and SWYNGHEDAUW, B. - Myosin isozymes redistribution in chronic heart overloading. Nature, 1979, 282 : 105-107.

76. LOMPRE-DOULOU, A-M. - Les isoenzymes de la myosine cardiaque de mammifères : mise en évidence et rôle dans la contractilité du myocarde. Thèse de Doctorat ès Sciences, Orsay Paris-Sud, 1982.

77. LORELL, B. H., PAULUS, W. J., GROSSMAN, W., WYNNE, J., COHN, P. F. and BRAUNWALD, E. - Improved diastolic function and systolic performance in hypertrophic cardiomyopathy. New Engl. J. Med., 1980, 303 : 801

78. MANRING, A., NASSAR, R. and JOHNSON, E. A. - Light diffraction of cardiac muscle : an analysis of sarcomere shortening and muscle tension. J. Mol. Cell. Cardiol., 1977, 9 : 441-459.

79. MARIKHIN, V. A. and MYASNIKOVA, L. P. - Light diffraction on the muscle fibres. I. Analysis of the geometrical pattern of diffraction. Tsitologiya, 1970, 12 : 1231-1236.

80. MARTONOSI, A. - The development of sarcoplasmic reticulum membranes. Annu. Rev. Physiol., 1982, 44 : 337-355.

81. MEAD, R. J., PETERSON, M. B. and WELTY, J. D. - Sarcolemmal and sarcoplasmic reticular ATPase activities in the failing canine heart. Circ. Res., 1971, 29 : 14-20.

82. MEERSON, F. Z. - The myocardium in hyperfunction, hypertrophy and heart failure. Circ. Res., 1969, 25 (n° 1 suppl. II) : 1-163.

83. MERCADIER, J. J., LOMPRE, A-M., WISNEWSKY, C., SAMUEL, J. L., BERCOVICI, J., SWYNGHEDAUW, B. and SCHWARTZ, K. - Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. Circ. Res., 1981, 49 : 525-532.

84. NASSAR, R., MANRING, A. and JOHNSON, E. A. - Light diffraction of cardiac muscle : sarcomere motion during contraction. In : The Physiological Basis of Starling's Law of the Heart. Ciba Foundation Symposium. Elsevier Excerpta Medica, North-Holland, 1974, pp. 57-82.

85. NAYLER, W. G. and FASSOLD, E. - Calcium accumulation and ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum before and after birth. Cardiovasc. Res., 1977, 11 : 231-237.

86. ORENTLICHER, M., REUBEN, J. P., GRUNDFEST, H. and BRANDT, P. W. - Calcium binding and tension development in detergent treated muscle fibres. J. Gen. Physiol., 1974, 63 : 168-186.

87. PAGE, E. and McCALLISTER, L. P. - Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. Am. J. Cardiol., 1973, 31 : 172-181.

88. PAGE, E. and BUECKER, J. L. - Development of dyadic functional complexes between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma in rabbit ventricular myocardial cells. Circ. Res., 1981, 48 : 519-522.

89. PAGE, S. G. and NIEDERGERKE, R. - Structures of physiological interest in the frog heart ventricle. J. Cell Sci., 1972, 11 : 179-203.

90. PAOLINI, P. J. and RHODES, N. L. - Technique for sarcomere length distribution measurement and clamping in muscle. Proc. S. D. Biomed. Symp., 1973, 12 : 59-63.

91. PAOLINI, P. J. and ROOS, K. P. - Length-dependent optical diffraction pattern changes in frog sartorius muscle. Physiol. Chem. Physics., 1975, 7 : 235-254.

92. PAOLINI, P. J., SABBADINI, R., ROOS, K. P. and BASKIN, R. J. - Sarcomere length dispersion in single skeletal muscle fibers and fiber bundles. Biophys. J., 1976, 16 : 919-930.

93. PAOLINI, P. J., ROOS, K. P. and BASKIN, R. J. - Light diffraction studies of sarcomere dynamics in single skeletal muscle fibers. Biophys. J., 1977, 20 : 221-232.

94. PARMLEY, W. W. and SONNENBLICK, E. H. - Relation between mechanics of contraction and relaxation in mammalian cardiac muscle. Am. J. Physiol., 1969, 216 : 1084-1091.

95. PATTERSON, S. W. and STARLING, E. H. - On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. J. Physiol. (Lond.), 1914, 48 : 357-379.

96. PATTERSON, S. W., PIPER, H. and STARLING, E. H. - The regulation of the heart beat. J. Physiol. (Lond.), 1914, 48 : 465-513.

97. POLLACK, G. H. and KRUEGER, J. W. - Sarcomere dynamics in intact cardiac muscle. Eur. J. Cardiol., 1976, 4 (suppl.) : 53-65.

98. POLLACK, G. H., IWAZUMI, T., KEURS ter, H. E. D. J. and SHIBATA, E. F. - Sarcomere shortening in striated muscle occurs in stepwise fashion. Nature, 1977, 268 : 557-559.

99. POPE, B., HOH, J. F. Y. and WEEDS, A. - The ATPase activity of rat cardiac myosin isoenzymes. FEBS Letters, 1980, 118 : 205-208.

100. RANVIER, L. - Du spectre produit par les muscles striés. Arch. Physiol., 1974 (2ème série, I), pp. 774-780.

101. ROME, E. - Light and x-ray diffraction studies of the filament lattice of glycerol-extracted rabbit psoas muscle. J. Mol. Biol., 1967, 27 : 591-602.

102. ROVETTO, M. J., HJALMARSON, A. C., MORGAN, H. E., BARRETT, M. J. and GOLDSTEIN, R. A. - Hormonal control of cardiac myosin adenosine triphosphatase in the rat. Circ. Res., 1972, 31 : 397-409.

103. RÜDEL, R. and ZITE-FERENCZY, F. - Interpretation of light diffraction by cross-striated muscle as bragg reflexion of light by the lattice of contractile proteins. J. Physiol. (Lond.), 1979a, 290 : 317-330.

104. RÜDEL, R. and ZITE-FERENCZY, F.- Do Laser diffraction studies on striated muscle indicate stepwise sarcomere shortening ? Nature, 1979b, 278 : 573-575.

105. SANDERSON, J. E., GIBSON, D. G., BROWN, D. J. and GOODWIN, J. F. - Left ventricular filling in hypertrophic cardiomyopathy : an angiographic study. Br. Heart J., 1977, 39 : 661-670.

106. SANDERSON, J. E., TRAILL, T. A., SUTTON, M. G. S. T. J., BROWN, D. S., GIBSON, D. G. and GOODWIN, J. F. - Left ventricular relaxation and filling in hypertrophic cardiomyopathy. An echocardiographic study. Br. Heart J., 1978, 40 : 596-601.

107. SANDOW, A. - Diffraction patterns of the frog sartorius and sarcomere behavior under stretch. J. Cell. Comp. Physiol., 1936a, 9 : 37-55.

108. SANDOW, A. - Diffraction patterns of the frog satorius and sarcomere behavior during contraction. J. Cell. Comp. Physiol., 1936 b, 9 : 55-75.

109. SCHWARTZ, A., SORDAHL, L. A., ENTMAN, M. L., ALLEN, J. C., REDDY, Y. S., GOLDSTEIN, M. A., LUCHI, R. J. and WYBORNY, L. E. - Abnormal biochemistry in myocardial failure. Am. J. Cardiol., 1973, 32 : 407-422.

110. SCHWARTZ, K., LECARPENTIER, Y., MARTIN, J. L., LOMPRE, A-M., MERCADIER, J. J. and SWYNGHEDAUW, B. - Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. J. Mol. Cell. Cardiol., 1981, 13 : 1071-1075.

111. SONNENBLICK, E. H. - Implications of muscle mechanics in the heart. Fed. Proc., 1962, 21 : 975-990.

112. SONNENBLICK, E. H. - Determinants of active state in heart muscle : force, velocity, instantaneous muscle length, time. Fed. Proc., 1965, 24 : 1396-1409.

113. SONNENBLICK, E. H. - Active state in heart muscle : its delayed onset and modification by inotropic agents. J. Gen. Physiol., 1967, 50 : 661-676.

114. SONNENBLICK, E. H., ROSS, J., COVELL, J. W., SPOTNITZ, H. M. and SPIRO, D. - Ultrastructure of the heart in systole and diastole. Circ. Res., 1967, 21 : 423-431.

115. SORDAHL, L. A., McCOLLUM, W. B., WOOD, W. G. and SCHWARTZ, A. - Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. Am. J. Physiol., 1973, 224 : 497-502.

116. STALEY, N. A. and BENSON, E. S. - The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. J. Cell. Biol., 1968, 38 : 99-113.

117. STARLING, E. H. - The arris and gale lectures on some points in the pathology of heart disease. Lecture I. The compensating mechanism of the heart. Lancet, 1897, 1 : 569-572.

118. STARLING, E. H. - The Linacre Lecture on the Law of the Heart. Longmans, Green & Co, London, 1918.

119. STEWART, S., MASON, D. T. and BRAUNWALD, E. - Impaired rate of left ventricular filling in idiopathic hypertrophic sub-aortic stenosis and valvular aortic stenosis. Circulation, 1968, 37 : 8-14.

120. SYS, S. U., HOUSMANS, P. R., Van OCKEN, E. R. and BRUTSAERT, D. L. - Mechanisms of load independence of relaxation during hypoxia in mammalian cardiac muscle. Am. J. Cardiol., 1981, 47 : 410 (abstract).

121. WEBER, A. and HERZ, R. - Relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. J. Gen. Physiol., 1968, 52 : 750-759.

122. WEBER, A. and MURRAY, J. M. - Molecular control mechanisms in muscle contraction. Physiol. Rev., 1973, 53 : 612-673.

123. WHITE, D. and TAYLOR, E. W. - Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Biochemistry, 1976, 15 : 5818-1826.

124. WINEGRAD, S. - Studies of cardiac muscle with a high permeability to calcium produced by treatment with ethylenediaminetetraacetic acid. J. Gen. Physiol., 1971, 58 : 71-93.

125. WINEGRAD, S. - Spontaneous mechanical activity in depolarized frog ventricle. J. Gen. Physiol., 1976, 68 : 145-157.

Version corrigée. Seconde soumission à Circulation Research

# REAL-TIME KINETICS OF SARCOMERE RELAXATION BY LASER DIFFRACTION

Yves Lecarpentier, Jean-Louis Martin, Victor Claes, Jean-Paul Chambaret, Arnold Migus, André Antonetti and Pierre-Yves Hatt

I.N.S.E.R.M. U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes and Laboratoire d'Optique Appliquée E.N.S.T.A., Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France.

This work was supported by a grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRL n° 82 50 45) and A.T.P. 63-78-95.

Abbreviated title : Sarcomere Relaxation in Mammalian Heart Muscle.

Address for correspondence : Yves Lecarpentier, M.D. I.N.S.E.R.M. U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes, France. Tél (1) 569.32.26.

SUMMARY.

Kinetics of sarcomere movement were studied in real time by laser diffraction. Instantaneous sarcomere shortening was measured during afterloaded twitches simultaneously with instantaneous shortening and tension of a whole trabecula excised from rat right ventricle. Resting sarcomere length at optimal length ($L_{max}$) was 2.20 $\pm$ 0.02 µm (mean $\pm$ SEM). Maximum amplitude of sarcomere shortening was 0.30 $\pm$ 0.01 µm and 0.16 $\pm$ 0.01 µm respectively in twitches loaded with preload only and in "isometric" twitches. When the isotonic load (expressed in terms of % of isometric total load TT) increased, the maximum velocity of sarcomere relaxation maxVr (µm/s) decreased : $maxVr = -4 \exp(-2.5\ 10^{-2}\ \%\ TT)$ ; $r = 0.95$. The time course of sarcomere relaxation appeared to be progressively delayed when the total load increased from only preload up to "isometric" load. Sarcomere relaxation occurred in two successive exponential phases, a rapid phase (time-constant (ms) : $\tau 1$) followed by a slower one (time-constant $\tau 2$). When the total load increased $\tau 1$ increased and $\tau 2$ decreased according to the linear relations : $\%\ TT = 0.2\ \tau 1 \pm 4.8$ ($r = 0.83$) and $\%\ TT = -0.1\ \tau 2 \pm 157$ ($r = 0.95$). The relative predominance of both the time course and the amplitude of these two phases depended upon the level of total load. The rapid process predominated at low load, the slow one at high load. The role of the load and/or shortening on the time course of these two phases are discussed.

Index terms : Laser diffraction. Sarcomere length. Cardiac relaxation.

INTRODUCTION.

Sarcomere movement in intact cardiac muscle has usually been studied under isometric conditions during the relaxation phase (Krueger and Strobeck, 1978 ; Krueger and Farber, 1980). Little is known about real time sarcomere dynamics recorded simultaneously with the mechanical behavior of the whole muscle either contracting at various levels of isotonic load or after rapid modifications of loading conditions. Different mechanisms interact to control both isotonic lengthening and isometric tension decay and their interdependence is not well established. Despite the fact that sarcoplasmic calcium concentration plays a major role in numerous steps of excitation-contraction coupling involved in force generation, this concentration has been shown, by aequorin technique, to be largely lowered at the time of peak isometric tension (Ashley and Ridgway, 1970 ; Taylor et al., 1975 ; Allen and Blinks, 1978 ; Blinks et al., 1978 ; Gordon and Ridgway, 1978 ). Thus, uncertainties remain concerning intracellular mechanisms governing the slow decline of isometric tension under conditions of low sarcoplasmic calcium concentration. Moreover relaxation has recently been shown to be sensitive to the level of external load in both mammalian heart muscle (Brutsaert et al., 1978b ; Brutsaert et al., 1980) and in spontaneously beating single cardiac cells (Lecarpentier et al., 1979) in which the sarcoplasmic reticulum was still functional. Intracellular calcium sequestering systems, particularly the sarcoplasmic reticulum, have been assumed to partially account for this property, which disappears in mammalian heart muscle treated with caffeine (Lecarpentier et al., 1979), and which is not observed in frog myocardium (Brutsaert et al., 1978b). The present study extends these observations by examining sarcomere kinetics during cardiac relaxation both in "isotonic" and "isometric" contractions and demonstrates that two mechanisms are involved during cardiac relaxation. The first, which is a rapid process, prevails at low load, while the second one, which is slow, prevails at high load.

METHODS.

1. Experimental system and mounting procedure.

Adult Wistar rats (n = 10) were anaesthetized with ether. The heart was quickly removed and transferred to a dissection chamber filled with an oxygenated physiological saline solution. The aorta was cannulated and perfused with the same salt solution at a flow rate of 5 ml/min. Small and uniformly shaped trabeculae or thin papillary muscles were rapidly excised from the right ventricle and mounted horizontally in a rectangular (1 x 5 cm) perfusion chamber. The glass bottom (0.2 mm thickness) allowed visual observation under an inverted Reichert microscope (Fig. 1). Dimensions of trabeculae and papillary muscles (length, width, thickness and cross-sectional area) are presented on Table 3.

The physiological solution used during dissection and experiments consisted of the following components in $mM.l^{-1}$ : NaCl 118 ; KcL 4.7 ; $NaHCO_3$ 24 ; $MgSO_4{}^7H_2O$ 1.2 ; $KH_2PO_4$ 1.1 ; $CaCl_2{}^6H_2O$ 2.5 and glucose 4.5. This solution was in equilibrium with 95 % $O_2$ and 5 % $CO_2$ (pH = 7.4) and maintained at 24 °C. The preparations were electrically stimulated by means of two parallel silver electrode wires delivering 5 msec square pulses at a voltage slightly above threshold, and at 12 beats/mn.

After a $\frac{1}{2}$ hour stabilization period, $L_{max}$, i. e. the initial length at the apex of the length-tension curve, was determined. The remainder of the experiment was carried out with the preload corresponding to $L_{max}$.

2. Optical techniques.

A 5 mw Helium-Neon laser (L) transilluminated a right ventricular rat trabecula or a thin papillary muscle horizontally mounted in the experimental chamber on the stage of an inverted microscope (Fig. 1). Thin cardiac muscle of this type acts as a tridimensional grating due to the regular array of sarcomeres, and diffracts the laser lines along several orders

(+1 and -1 and in most cases +2 and -2). The spacing between zero and first order of the diffraction pattern was calculated according to the Bragg equation $SL = \lambda/\sin\theta$ where SL is the mean sarcomere length, $\lambda = 0.628$ μm the wavelength of the laser and $\theta$ the angular separation of the first-order diffraction line relative to the zero-order reference line. The laser beam passed through an adjustable slit and a 45 mm focal length lens, and was then collected with a 63 x objective. The slit was positioned before the lens so that its image (40 x 200 μm) was focussed on the focal plane of the objective and could be superimposed with the image of the trabecula. Both images were simultaneously observed through the microscope ocular or on the monitor of a video camera.

A region with uniform sarcomeres was selected in the midlength of the specimen. This region containing about one hundred sarcomeres in series was exactly superimposed with the laser spot whose outline was determined by the adjustable slit. The diffraction pattern was then examined above the muscle chamber.

From the meridional diffraction pattern (Fig. 1) we selected the first-order line through an aperture and collected it through a lens which gave a parallel output. The beam was then split (B) into two equal parts. One beam was focussed onto the diode $D_2$ producing the signal h which represented the variation of intensity of the first-order line. The other beam passed through an optical density wedge (W) whose transmission was related to the lateral shift of the beam and consequently to the grating constant due to the change in the diffraction angle. This beam was then collected and focussed onto the diode $D_1$ giving the signal g which represented the product of the variation of intensity of the first-order diffraction line and the variation of intensity due to the beam's lateral movement on the densitometric wedge. These signals were normalized so that initially g/h equals 1. During the twitch, the electronic system computed, in real time, the ratio g/h which is directly

related to the instantaneous sarcomere length (SL) through the relationship $SL = SL_o (1 + \alpha \log g/h)^{-1}$ where $SL_o$ is the sarcomere length at rest and at $L_{max}$ and $\alpha$ a constant characteristic of the optical set-up. In our experimental conditions this expression can be linearized : $SL = SL_o [1 + \alpha(1 - g/h)]$. Calibration of the sarcomere length at rest was checked by replacing the trabecula with a grating of known spacing. The lag-free diffractometor gives the absolute value of the sarcomere length with a $\pm$ 120 Å uncertainty. When the illuminated region in the midlength of the trabecula was changed, the intensity variations (h) were modified but not the ratio g/h, i. e. the variations in sarcomere length during contraction. The ratio g/h represented the mean length value of about 50 to 100 sarcomeres illuminated by the laser beam and was independent of the muscle portion observed through the slit.

3. Electromagnetic lever system.

A miniature panel meter (Eagle-Picher Industries, Inc. - sensitivity = 100 $\mu$A ; internal resistance = 600 Ohms) with center zero was adapted by substituting the pointer with a stainless steel tube and two small aluminium supports. This part was attached to the coil by epoxy cement. The rod was bent into the shape of a hook. The equivalent moving mass of the whole system (lever and coil) was 40 mg. The displacement of the lever was measured by means of an opto-electronic system mounted in the panel meter. The light beam of a miniature infra-red light emitting diode (LS 600) was modulated by a small shutter on the lever and captured by a small photodiode (H 35). The resulting signal was amplified and linearized with operational amplifier circuits. The linear range was 1 mm with a linearity of 1 %. The displacement signal was filtered with a third order Raynter low pass filter (optimal transient response - cut off freq = 100 Hz). The filtered signal was differentiated with an active differentiator circuit. The RC constant could be set to .1, .05, .02 and .01 sec.

Force generation and measurement.

The coil of the lever system was suspended in the field of a permanent magnet. The torque on the lever and hence the loading on the preparation was proportional to the current through the coil when the lever was within the linear displacement range. The current was generated by a current source and set by means of decade switches in calibrated steps of .05 and 1 mN up to a total of 10 mN. Load alterations could be performed by switching the current to a second level controlled by a second set of decade switches.

A unilateral force-sensing feedback circuit controlled the current source. This method is described elsewhere (De Clerck et al., 1978) and only a short overview is given here. The unfiltered displacement signal was compared to a present reference level, representing the position of an "electronic stop". If the length signal was higher than this level, no feedback occurred and the preparation carried the load set by means of the decade switches. When it became lower, the lever was held in that position by the feedback mechanism and the current through the coil was proportionally decreased and represented the load carried by the preparation. By adjusting this reference level, resting length and preload could be set. If the preparation developed a higher force than the load set with the decade switches, isotonic shortening occurred. In the course of an isometric contraction, the lever moved a very small amount (proportional to the developed force). This static compliance amounted to 1.2 μm/mN and the dynamic compliance was negligible. The force signal was filtered and differentiated with the same kind of circuits as those of the length signal to minimize relative phase errors.

RESULTS.

Mechanical parameters of sarcomere kinetics.

Sarcomere relaxation behavior was tested by either loading

the muscle at various levels or by modifying the total load with load clamp steps during isotonic shortening. Real-time sarcomere shortening (SL) was registered simultaneously with muscle shortening (ML) and with muscle tension (MT). Figure 2 shows SL, ML and MT in a typical muscle, contracting at four levels of total load. Sarcomere kinetics clearly depended upon the loading conditions. When the load was increased from preload only (twitch a) up to isometric load (twitch d) there was a progressive decrease in the maximum amplitude of sarcomere shortening and in the peak velocities of shortening and of lengthening. Hereafter, the term "isometric" will refer exclusively to the mechanical behavior of the whole trabecula : indeed, when the total load became high enough, no external shortening of the whole muscle occurred. This contrasts with the internal sarcomere shortening observed in such "isometric" loading conditions (Fig. 2, twitch d). Values of mechanical sarcomere parameters during both twitch with preload only and "isometric" twitch are expressed as mean $\pm$ SEM in Tables 1 and 2. When the trabecula was preloaded only, maximum sarcomere shortening reached 0.30 $\pm$ 0.01 µm which represented 13.6 $\pm$ 0.4 percent of $SL_o$ (Table 1). During the "isometric" twitch, maximum amplitude of shortening measured 0.16 $\pm$ 0.01 µm and corresponded to 7.0 $\pm$ 0.5 percent of $SL_o$ = 2.20 $\pm$ 0.02 µm (Table 1). Maximum speed of sarcomere shortening was 2.09 $\pm$ 0.11 µm/sec in twitch with preload only and 0.84 $\pm$ 0.11 µm/sec in the "isometric" twitch (Table 2). Peak velocities of sarcomere relaxation were respectively 3.95 $\pm$ 1.13 µm/sec and 0.51 $\pm$ 0.12 µm/sec in twitch preloaded only and in the "isometric" twitch (Table 2). At low load, sarcomere peak lengthening velocity was higher than sarcomere peak shortening velocity, and the inverse was observed at heavy load (Table 2 : D/C ratio). Moreover, the ratio of preloaded twitch velocity over "isometric" twitch velocity (Table 2 : A/B ratio) was 8.95 $\pm$ 1.40 and 2.76 $\pm$ 0.41 during the relaxation and contraction phase respectively. The force-sarcomere velocity relationships

during contraction and relaxation are presented on Figure 5 and Table 2.

The time course of sarcomere shortening differed strikingly from that of sarcomere lengthening according to the loading conditions. In a series of afterloaded twitches with similar preload (Fig. 2), sarcomere shortening initially presented a common pathway whose duration increased with total load, although sarcomere versus time curves appeared to be dissociated for each twitch during relaxation phase (Fig. 2, twitches a, b, c and d). When total load increased from twitch a with preload only up to isometric twitch d (Fig. 2), time-to-peak sarcomere shortening barely increased and further time course of sarcomere relaxation appeared to be progressively delayed. The higher the total load, the later a given degree of sarcomere lengthening occurred. Twitch a with preload only rapidly reached its initial resting length. Sarcomere relaxation of afterloaded twitches b and c displayed two distinct and successive phases of auxotonic relaxation. First, a short and rapid phase, lasting about 50-70 msec, during which the main part of sarcomere lengthening was achieved. Second, a slow phase occurred, during which sarcomeres lengthened until the initial resting length. In afterloaded twitches b and c (Fig. 2), the transition from the rapid phase to the slow phase corresponded in time to the transition between the successive isotonic and isometric relaxation-phases of muscle tension (MT). The degree of sarcomere lengthening which was reached at the time of this transition increased when the load decreased. During the rapid phase the instantaneous speed of sarcomere lengthening was higher in the afterloaded twitch b than in twitch c. Inversely, at a given time of the slow phase, instantaneous velocity of sarcomere lengthening was higher in the afterloaded twitch c than in twitch b. Moreover, when the load increased, the amplitude of sarcomere lengthening respectively decreased during the rapid phase and increased during the slow phase. In "isometric" twitch d, the rapid phase disappeared and only the slow phase was observed. The relaxation time course of the "isometric" twitch d was markedly delayed as compared with that of twitches a, b and c and appeared to occur simultaneously with

the decay of the "isometric" force versus time curve (MT) of twitch d. The time-constants $\tau 1$ and $\tau 2$ of the rapid and slow phases respectively were linearly related to the total load : % TT = 0.2 $\tau 1 \pm 4.8$ and % TT = -0.1 $\tau 2 \pm 157$ (Figure 6).

Load sensitivity of sarcomere relaxation.

The load bearing capacity of sarcomeres was also tested during isotonic contractions by triggering small abrupt modifications in load (load clamp steps) of various amplitude and at different times during the twitch. In Figure 3, two afterloaded twitches b and c were rapidly load-clamped from 3 mN to a final total load of 5 mN which was the total load of the control twitch a. In twitch b (Fig. 3), alteration in load was imposed early during the contraction phase, and further time course of contraction and relaxation was slightly prolonged. On the other hand, if the load step occurred during the last third of the shortening phase as in twitch c, the time course of sarcomere relaxation became markedly abbreviated. For a given isotonic load, the onset of isometric relaxation of the whole trabecula depended upon the timing of load-clamp steps. In the load-clamped twitches b and c, sarcomere relaxation occurred in two successive phases, similar to that observed in control twitch a. For the three twitches a, b and c (Fig. 3), the degree of sarcomere relengthening measured at the "MT isotonic - isometric transition" was similar. The sarcomere relengthening level at this time corresponded to the end of the rapid phase of relaxation and occurred independently of the time at which the load-clamp was triggered. Thus the onset and the end of the rapid phase of sarcomere relaxation clearly depended either on the level of total load, or on the time at which the final level of total load was reached after the load-clamp steps. Later on, the slow phase of sarcomere relaxation of twitches a, b and c (Fig. 3) exhibited a common pathway in returning to the resting length.

These results were corroborated by those shown in Figure 4, which also test the influence of the load on the time course of sarcomere relaxation. Load-clamp steps of various amplitude were imposed at the same moment during the last third of the shortening phase. These modified the load-bearing capacity of the muscle and shortened the time to sarcomere relaxation. As in Figure 3, sarcomere relaxation presented a rapid phase followed by a slow one. The higher the amplitude of the load-clamp step, the sooner the rapid phase occurred. The duration of the rapid phase was almost the same in twitches a, b and c (Figure 4). The slow phase began at the "MT isotonic - isometric transition" and the degree of sarcomere lengthening at this time was similar in the three twitches a, b and c. Then, the sarcomere resting length was reached at the end of the common pathway of the slow phase .

In summary, real-time kinetics of sarcomere during relaxation lead to the following conclusions. Sarcomere lengthening occurred in two successive phases, which can be modulated independently. The transition between these two phases occurred at the "MT isotonic-isometric transition". During the rapid phase, both the amplitude and the instantaneous velocity of sarcomere lengthening increased when the load decreased. The inverse was observed during the slow phase. Moreover, for a given final level of total load, three parameters of sarcomere relaxation did not appear to be significantly modified by loading changes previously imposed during the twitch, and remained independent of both timing (Fig. 3) and/or amplitude (Fig. 4) of the load-clamp steps. These three parameters were : (i) the overall duration of the rapid phase of sarcomere lengthening ; (ii) the degree of sarcomere lengthening reached at the end of the rapid phase ; (iii) the common pathway of the slow phase. The onset and the duration of the rapid phase, and consequently the onset of the slow phase depended upon previous modifications of the loading conditions during the twitch.

DISCUSSION.

Dynamics of sarcomere shortening and lengthening.

This paper focuses on the mechanical behavior of sarcomeres during relaxation at various levels of load. In Table 2, the D/C ratio showed that, at low load, the maximum speed of lengthening was twice the maximum speed of shortening. Moreover, the range of sarcomere speed variation between the lightest and the heaviest loads was quantified with the A/B ratio (Table 2). This ratio ($\pm$ SEM) was about three times higher during the relaxation phase ($8.95 \pm 1.40$) than during the contraction phase ($2.76 \pm 0.41$). These results reveal the complex influence that the level of instantaneous load has upon intracellular mechanisms involved in sarcomere contraction and relaxation processes. Sarcomere velocity and sarcomere shortening shown in Tables 1 and 2 appeared to be of a comparable order of magnitude to that observed by other investigators. In twitches where the load remained a small fraction of isometric load, Pollack and Krueger (1976) observed that the maximum unloaded sarcomere velocity reaches 10 μm/sec in rat cardiac trabecula. Similar values have been found by Krueger, Forletti and Wittenberg (1980) in isolated cardiac cells during unloaded contraction. In our study, however, the maximum speed of sarcomere shortening was measured in the preloaded twitch which represented $17 \pm 2$ % of maximum "isometric" tension. This preloaded twitch differs somewhat from unloaded conditions and accounts for the fact that we obtained lower values as compared with those of Pollack and Krueger (1976). This also explains the average sarcomere length at peak shortening of the preloaded twitch ($1.90 \pm 0.02$ μm, Table 1) rather than the 1.6 μm found in unloaded contraction by Pollack and Krueger (1976), ter Keurs (1978) in intact papillary muscle and Krueger et al. (1980) in single cardiac cell. At peak isometric tension, we found the same internal sarcomere shortening (7 % of the resting sarcomere length at $L_{max}$) as that previously measured by Krueger and Pollack (1975). This

internal sarcomere shortening observed during "isometric" contraction has been shown to be due to large series compliance in damaged ends of the preparation (Krueger and Pollack, 1975).

Time course of sarcomere relaxation occurring in two phases.

Sarcomere relaxation was characterized by two successive phases whose relative importance was "balanced" by the general loading conditions. The rapid phase corresponding to the "isotonic phase" of the whole muscle lengthening contributed to the major part of relengthening. The slow phase terminated sarcomere lengthening and corresponded to the slow final decay of isometric tension. The onset and duration of the first rapid phase of sarcomere relaxation appeared to be modulated by the level of load, the amplitude of load variations and the time at which a given level of final total load was imposed (or triggered). In twitches load-clamped to the same final total load, the relengthening level of the sarcomere at the end of the rapid phase was very slightly modified as compared with the timing modifications (Fig. 3, 4). In such twitches, the slow phase presented a common trajectory slowly reaching the initial resting sarcomere length. The relative contribution of the two phases during sarcomere relaxation appeared to be a function of the level of load. At low load, the rapid phase was predominant, while the second phase became predominant at heavy load. The transition between these two phases was quite evident, particularly at low load. The fact that these two phases could not be fitted with a single exponential function argues in favor of two different mechanisms. This idea was substantiated by the observation of the rapid phase only, during the preloaded twitch, and of the slow phase only, during the "isometric" twitch.

Other investigators have shown that sarcomere relaxation in mammalian muscle could be characterized by two distinct phases. In unloaded single cardiac cell, Krueger et al. (1980) have found that sarcomere lengthening successively presents a rapid relaxation phase followed by a very slow one. Moreover,

a biphasic curve has been observed in intact cardiac muscle in which relaxation is terminated by a slow phase of isometric tensio decline (Krueger and Farber, 1980). These phases were assumed to be governed by distinct mechanisms (Krueger and Strobeck, 1978) as suggested by the opposite effects of calcium on isometric and isotonic relaxation (Strobeck et al., 1975). Various hypotheses have been proposed to explain rapid sarcomere lengthening. Restoring forces occur at sarcomere length below the slack length (1.90 μm), where one might expect a significant effect on sarcomere relaxation. In our study, sarcomere length at peak shortening in twitch with preload only just reached $1.90 \pm 0.02$ μm (Table 1) and restoring forces could not be involved in the rapid phase of sarcomere relaxation. In vertebrate striated muscle, it has been suggested that relaxation could result from potential energy stored within myofibrils (Gonzales-Serratos, 1966 ; Parsons and Porter, 1967). Alternatively, myoplasmic calcium regulation by intracellular calcium sequestering systems, particularly the sarcoplasmic reticulum (Fabiato and Fabiato, 1976), is involved in relaxation. Additional arguments strengthen the possible role played by the sarcoplasmic reticulum in the regulation of rapid relengthening. Recently, the possibility of modifying the timing of the isotonic-isometric relaxation transition by using altered loading conditions has been reported (Brutsaert et al., 1978a, b). This load sensitivity implies the presence of an efficient sarcoplasmic reticulum. This is the case in mammalian heart muscle (Brutsaert et al., 1978b) and isolated single cardiac cell (Lecarpentier et al., 1979) in which the sarcoplasmic reticulum is preserved. This property disappears in mammalian single cardiac cell after pretreatment with the detergent BRIJ-58 (Brutsaert, 1978a) which destroys both the sarcolemma and sarcoplasmic reticulum (Orentlicher et al., 1974 ; Fabiato and Fabiato, 1975). Load sensitivity also disappears in cat and rat heart papillary muscles in a caffeine medium (Lecarpentier et al., 1979) which partially inhibits the sarcoplasmic reticulum (Weber and Herz, 1968).

Furthermore, the load sensitivity of relaxation is not observed in frog ventricular strip (Brutsaert, 1978b) where the sarcoplasmic reticulum is scarcely developed (Staley and Benson, 1968), nor in newborn rat myocardium (personal observation) in which the sarcoplasmic reticulum is not yet functional. This regulatory mechanism appears to be of physiological and pathological relevance because it disappears after hypoxia (Chuck et al., 1981) but persists during cardiac hypertrophy (Lecarpentier et al., 1982), induced by chronic pressure and volume overload. These arguments are corroborated by both phylogenic and ontogenic arguments involving the sarcoplasmic reticulum in intracellular calcium movements : the $Ca^{2+}$-induced release of $Ca^{2+}$ from the sarcoplasmic reticulum is well-developed in adult rat ventricle and absent in frog myocardium and in newborn rat ventricle (Fabiato and Fabiato, 1978). Our experiments have shown that, for a given isotonic total load, the isotonic-isometric relaxation transition of the whole muscle occurs at the same time as the end of the rapid phase of sarcomere relaxation (Fig. 2, 3, 4). This argues in favor of partial involvement of the sarcoplasmic reticulum in the time course of the rapid phase of sarcomere relaxation, particularly at low load.

On the other hand, the intracellular mechanisms governing cardiac relaxation at high load have not yet been clearly understood. As previously discussed by Krueger and Farber (1980), relaxation is terminated by a slow phase during isometric tension decline. The free calcium concentration, studied with the aequorin technique, has been shown to return almost to its level at rest, long before isometric tension decay (Taylor et al., 1975 ; Gordon and Ridgway, 1978). The molecular mechanism of this isometric force decline at low calcium concentration remains uncertain, but might be explained by subtle interactions between actin and myosin filaments or by a cooperative effect modifying myofilament calcium affinity (Bremel et al., 1972 ; Taylor et al., 1975). Moreover, additional evidences support a link between the calcium binding properties of Troponin C and observed length changes. It has been established that

the free calcium sensitivity of "skinned" skeletal fibers depends upon sarcomere length (Endo, 1972) and sug-gesting that the calcium affinity of Troponin C would be lower for shorter sarcomere lengths. Various other experiments have recently suggested that the binding constant of Troponin C for calcium would be influenced by the developed tension (Allen and Kurihara, 1982). Our results appear to be compatible with such a hypothesis : at high load, the calcium affinity of Troponin would seem to be higher than at low load and thus could explain the slow decline of tension, the low speed of sarcomere relenthening and delayed relaxation (Tables 1, 2 and Fig. 2). Conversely, at low load the decrease in Troponin calcium affinity would allow a rapid calcium removal from Troponin C to intracellular sequestering systems, in particular the sarcoplasmic reticulum which might then account for the high velocity of sarcomere relaxation. In such relatively low loading conditions, the influence of the sarcoplasmic reticulum could be expressed as the load sensitivity of sarcomere relaxation (Fig. 2 and 3). In conclusion a balance between two linked mechanisms would seem to modulate the time course of sarcomere relaxation, according to the level of load and of shortening : at heavy load the slow removal of calcium from Troponin could decelerate and delay sarcomere relaxation. At low load, the sarcoplasmic reticulum could partially limit the relaxation velocity and regulate the onset, duration and end of the rapid phase of sarcomere relaxation.

Acknowledgment : We wish to acknowledge the technical assistance of Armido Dos Santos, the secretarial expertise provided by M.-Th. Dronne, and A. Orszag for the use of laboratory facilities.

REFERENCES.

Allen DG, Blinks JR (1978) Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. Nature (Lond) 273 : 509-513

Allen DG, Kurihara S (1982) The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J Physiol (Lond) 327 : 79-94

Ashley CC, Ridgway EB (1970) On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in single barnacle muscle fibres. J Physiol (Lond) 209 : 105-130

Blinks JR, Rüdel R, Taylor SR (1978) Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres : detection with aequorin. J Physiol (Lond) 277 : 291-323

Bremel RD, Murray JM, Weber A (1972) Manifestations of cooperative behavior in the regulated actin filament during actin-activated ATP hydrolysis in the presence of calcium. In : Symposia on Quantitative Biology, vol 37, edited by J Gordon. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp 267-272

Brutsaert DL, Claes VA, De Clerck NM (1978a) Relaxation of mammalian single cardiac cells after pretreatment with the detergent BRIJ-58. J Physiol (Lond) 283 : 481-491

Brutsaert DL, De Clerck NM, Goethals MA, Housmans PR (1978b) Relaxation of ventricular cardiac muscle. J Physiol (Lond) 283 : 469-480

Brutsaert DL, Housmans PR, Goethals MA (1980) Dual control of relaxation : its role in the ventricular function in the mammalian heart. Circ Res 47 : 637-652

Chuck LH, Goethals MA, Parmley WW, Brutsaert DL (1981) Load-insensitive relaxation caused by hypoxia in mammalian cardiac muscle. Circ Res 48 : 797-803

De Clerck NM, Claes VA, Brutsaert DL (1977) Force velocity relations of single cardiac muscle cells. Calcium dependency. J Gen Physiol 69 : 221-241

Endo M (1973) Length dependence of activation of skinned muscle fibres by calcium. In : Symposia on Quantitative Biology, vol 37, edited by J Gordon, New York, Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp 505-510

Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J Physiol (Lond) 249 : 469-495

Fabiato A, Fabiato F (1976) Dependence of calcium release, tension generation and restoring forces on sarcomere length in skinned cardiac cells. Eur J Cardiol 4 (suppl) : 13-27

Fabiato A, Fabiato F (1978) Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. Ann N Y Acad Sci 307 : 491-522

Gonzalez-Serratos H (1966) Spontaneous elongation of myofibrils during relaxation of skeletal muscle fibers. J Physiol (Lond) 186 : 17P-18P

Gordon AM, Ridgway EB (1978) Calcium transients and relaxation in single muscle fibers. Eur J Cardiol 7 (suppl) : 27-34

Keurs HEDJ ter, Bloot R, Rijnsburger WH, Nagelsmit MJ (1978) The influence of sarcomere length on tension development in rat heart muscle. Biophys J 21 : 86a

Krueger JW, Farber S (1980) Sarcomere length "orders" relaxation in cardiac muscle. Eur Heart J 1 (suppl A) : 37-47

Krueger JW, Forletti D, Wittenberg BA (1980) Uniform sarcomere shortening behavior in isolated cardiac muscle cells. J Gen Physiol 76 : 587-607

Krueger JW, Pollack GH (1975) Myocardial sarcomere dynamics during isometric contraction. J Physiol (Lond) 251 : 627-643

Krueger JW, Strobeck JE (1978) Sarcomere relaxation in intact cardiac muscle. Eur J Cardiol 7 (suppl) : 79-96

Lecarpentier YC, Chuck LHS, Housmans PR, De Clerck NM, Brutsaert DL (1979) Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle. Am J Physiol 237 : H455-H460

Lecarpentier YC, Martin JL, Gastineau P, Hatt PY (1982) Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure. Am J Physiol 242 : H855-H861

Orentlicher M, Reuben JP, Grundfest H, Brandt PW (1974) Calcium binding and tension development in detergent treated muscle fibres. J Gen Physiol 63 : 168-186

Parsons C, Porter KR (1966) Muscle relaxation : evidence for an intrafibrillar restoring force in vertebrate striated muscle. Science 153 : 426-427

Pollack GH, Krueger JW (1976) Sarcomere dynamics in intact cardiac muscle. Eur J Cardiol 4 (suppl) : 53-65

Staley NA, Benson ES (1968) The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. J Cell Biol 38 : 99-113

Strobeck JE, Bahler AS, Sonnenblick EH (1975) Isotonic relaxation in cardiac muscle. Am J Physiol 229 : 646-651

Taylor WR, Rüdel R, Blinks JR (1975) Calcium transients in amphibian muscle. Fed Proc 34 : 1379-1381

Weber A, Herz R (1968) Relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. J Gen Physiol 52 : 750-759

TABLE 1

Mechanical parameters of sarcomere shortening

| | Twitch with preload only | "Isometric" twitch |
|---|---|---|
| Sarcomere length at rest ($SL_o$) ($\mu m$) | 2.20 ± 0.02 | 2.20 ± 0.02 |
| Final sarcomere length at peak shortening ($\mu m$) | 1.90 ± 0.02 | 2.04 ± 0.02 |
| Maximum amplitude of sarcomere shortening ($\mu m$) | 0.30 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 |
| Percentage of maximum sarcomere shortening (%) | 13.6 ± 0.4 | 7.0 ± 0.5 |

Data are shown as mean ± SEM. All the mechanical parameters were calculated in seven muscles. This Table shows the mechanics of sarcomere during the twitch loaded with preload only and during "isometric" twitch. Mean values (± SEM) of the whole trabeculae were : resting tension at $L_{max}$ = 0.9 ± 0.1 mN ; maximum isometric tension at $L_{max}$ = 5.4 ± 0.8 mN ; resting tension/total tension ratio = 17 ± 2 %. Total tension per cross-sectional area 105 ± 6 $mN/mm^2$.

TABLE 2

Maximum sarcomere velocity

| | Twitch with preload only (A) | Isometric twitch (B) | A/B ratio |
|---|---|---|---|
| Peak velocity of contraction (C) | 2.09 ± 0.11 µm/sec | 0.84 ± 0.11 µm/sec | 2.76 ± 0.41 |
| Peak velocity of relaxation (D) | 3.95 ± 1.13 µm/sec | 0.51 ± 0.12 µm/sec | 8.95 ± 1.40 |
| D/C ratio | 2.00 ± 0.51 | 0.62 ± 0.13 | |

Maximum sarcomere velocity during the twitch loaded with preload only (A) and during the "isometric" twitch (B). Peak velocity of contraction (C) and of relaxation (D) was calculated during (A) and (B). The A/B and D/C ratios are respectively listed in the third column and in the third line of this table. Data are shown as mean ± SEM.

TABLE 3. DIMENSIONS AND CHARACTERISTICS OF MUSCLES.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Muscle length | : | 2.6 | ± 0.2 | mm |
| Muscle width | : | 389 | ± 34 | µm |
| Muscle thickness | : | 167 | ± 15 | µm |
| Cross-sectional area(s) | : | 0.052 | ± 0.008 | $mm^2$ |
| Resting length at $L_{max}$ | : | 0.9 | ± 0.1 | mN |
| Resting length/$mm^2$ at $L_{max}$ | : | 16,4 | ± 1,4 | $mN/mm^2$ |

LEGENDS OF FIGURES.

Figure 1. Experimental set-up. Abbreviations are : L:laser ; MI : microscope ; V : video camera ; MC : muscle chamber ; B : beam splitter ; W : densitometric wedge ; $D_1$ and $D_2$ : diodes ; g and h : optical signals electronically converted by $D_1$ and $D_2$ respectively ; g/h : instantaneous sarcomere length ; T : electromagnetic transducer ; $B_1$ : stimulator ; M : muscle tension and shortening curves versus time (t) ; S : instantaneous sarcomere length curve versus time (t).

Figure 2. Real-time kinetics of sarcomere and whole cardiac trabecula. Muscle tension MT (top trace), muscle shortening length ML (middle trace), sarcomere shortening length SL (bottom trace) were plotted as a function of time. The sarcomere length trace was slightly smoothed. A series of four superimposed contractions (twitches a, b, c and d) can be seen against various loads, i. e., from isotonic twitch a with preload only (1 mN), then with various total loads (twitch b : 4 mN ; twitch c : 6 mN) ; up to a full "isometric" twitch d. These four contractions were similarly preloaded at $L_{max}$ with 1 mN. During "isometric" twitch d, ML did not shorten although SL decreased 7 % of its resting length value at $L_{max}$ ($SL_o$). When the afterload increased in twitches b, c, and d the mechanical parameters of sarcomere (i. e. maximum amplitude of sarcomere shortening, peak velocities of shortening and of lengthening) decreased, and further time courses of sarcomere relaxation appeared progressively delayed. Mechanical characteristics of this typical trabecula at $L_{max}$ and at rest : MT = 1 mN ; ML = 2.25 mm ; SL = 2.25 µm.

Figure 3. Muscle tension MT (top trace), muscle shortening length ML (middle trace), and sarcomere shortening length SL (bottom trace) were plotted as a function of time. Three twitches a, b and c were similarly preloaded at $L_{max}$ with 1 mN. Isotonic total load of control twitch a was maintained at 5 mN during the overall contraction. Total load of twitches b and c was 3 mN at the beginning of the contraction phase. An abrupt load clamp step of 2 mN was imposed during the twitches b and c, at two different times, in such a way that their final total load was similar to that of control twitch a (5 mN). In twitch b, the load clamp step was triggered relatively early during contraction and the subsequent time course of relaxation was barely delayed. In twitch c, the 2 mN load-clamp step was imposed a little later than in the case of twitch b, and the subsequent time course of twitch c was strikingly abbreviated. Mechanical characteristics of the trabecula were similar to those of figure 2.

Figure 4. Muscle tension MT (upper trace), muscle shortening length ML (middle trace), sarcomere shortening length SL (lower trace) were plotted as a function of time. Three twitches a, b and c were similarly preloaded at $L_{max}$. Isotonic total load of control twitch a was maintained at 5 mN during the overall duration of the twitch. Two load clamp steps of various amplitude (1 mN in twitch b and 2 mN in twitch c, respectively) were imposed at the same time in such a way that the final total load was similar to that of control twitch a (5 mN). These load-clamps were triggered at the same time as that imposed during twitch c in Figure 3. The higher the load step was, the shorter the overall duration of the twitch was. Mechanical characteristics of the trabecula : similar to those of Figure 2.

Figure 5. Relationship between total load and maximum sarcomere velocity during contraction (maxVc) and relaxation (maxVr). Total load was expressed in terms of percentage of total isometric force TT. Means values of sarcomere velocity were calculated at five increasing levels of % TT : 0 to 20 % TT ; 21 to 40 % TT ; 41 to 60 % TT ; 61 to 80 % TT and 81 to 100 % TT. Maximum velocity of sarcomere (µm/s) exponentially decreased when % TT increased according to the expressions :
$maxVc = 2.2 \exp(-1.4\ 10^{-2}\ \%\ TT)$ ($r = 0.95$) during the contraction phase and
$maxVr = -4 \exp(-2.5\ 10^{-2}\ \%\ TT)$ ($r = 0.95$) during the relaxation phase.

Figure 6. Relationship between total load and time-constants $\tau 1$ (rapid phase) and $\tau 2$ (slow phase). Total load was expressed in terms of the percentage of the total isometric force (% TT). $\tau 1$ and $\tau 2$ were linearly related to the % TT by the following expressions $\%\ TT = 0.2\ \tau 1 \pm 4.8$ ($r = 0.83$) and $\%\ TT = -0.1\ \tau 2 \pm 157$ ($r = 0.95$). The rapid process predominated at low load, the slow one at high load. The transition between the two phases was more precisely determined at low load than at high load where $\tau 1$ and $\tau 2$ were not strikingly different ($\tau 1/\tau 2 \simeq 0.5$ at 70 % TT).

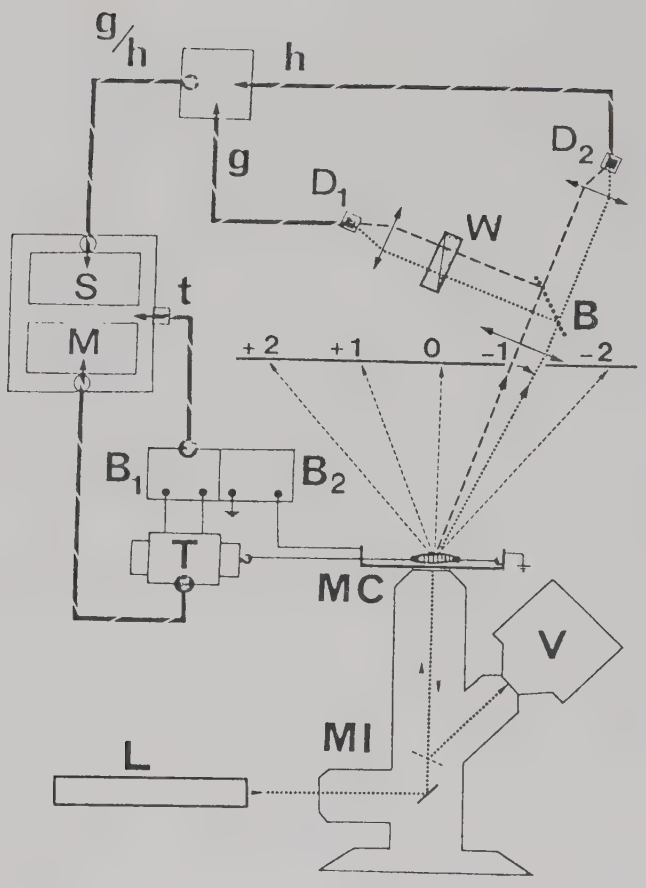

g/h
h
g
D2
D1
W
S
t
M
B
+2
+1
0
-1
-2
B1
B2
T
MC
V
MI
L

FIG.1

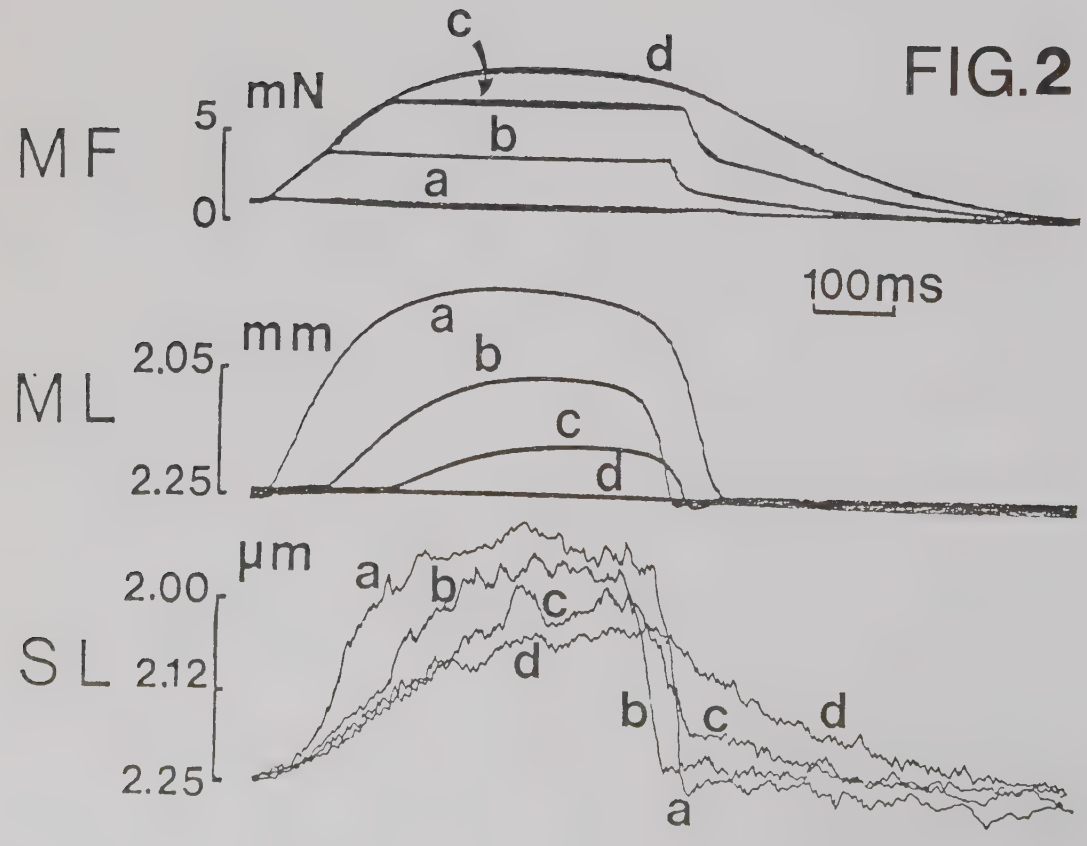

c
d
mN
5
MF
b
a
0
100ms
mm
a
2.05
b
ML
c
2.25
d
μm
a
2.00
b
c
SL
2.12
d
b
c
d
2.25
a

FIG.2

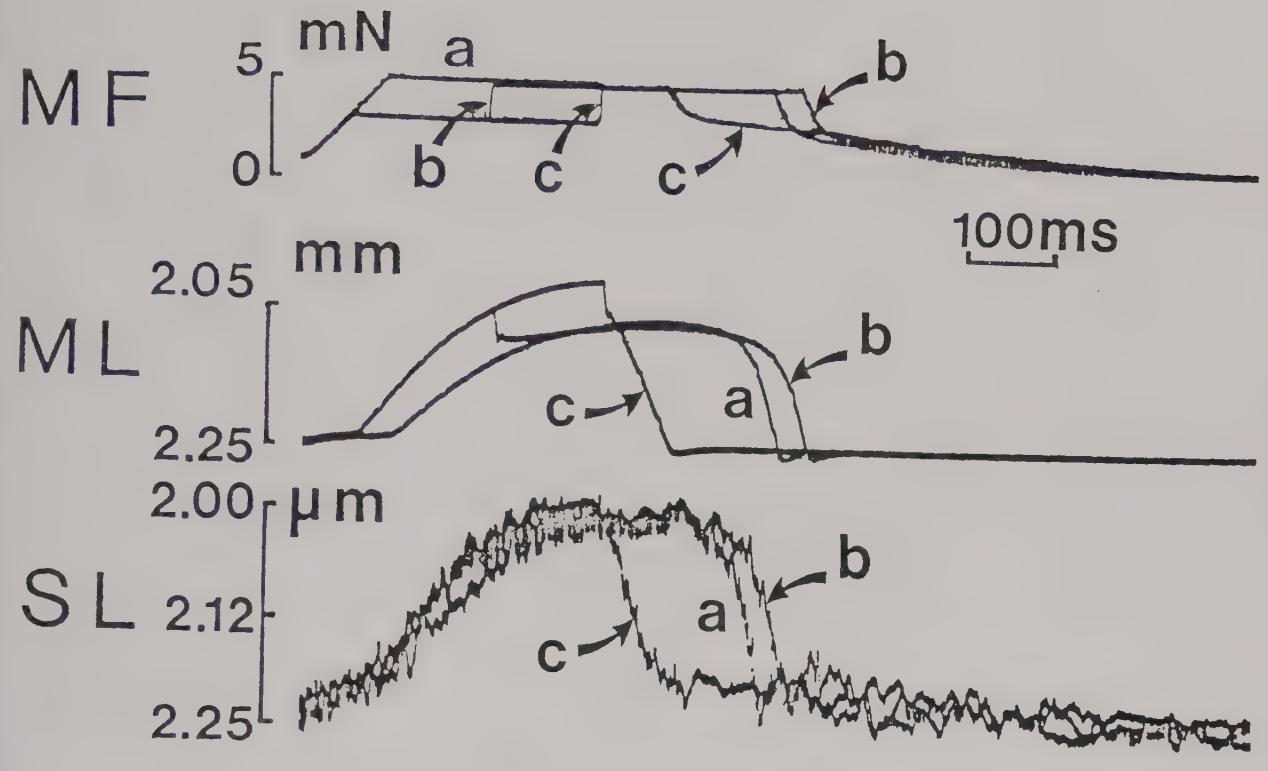

MF
5
0
mN
a
b
b
c
c
100ms
ML
2.05
2.25
mm
b
c
a
SL
2.00
2.12
2.25
μm
b
a
c

FIG.3

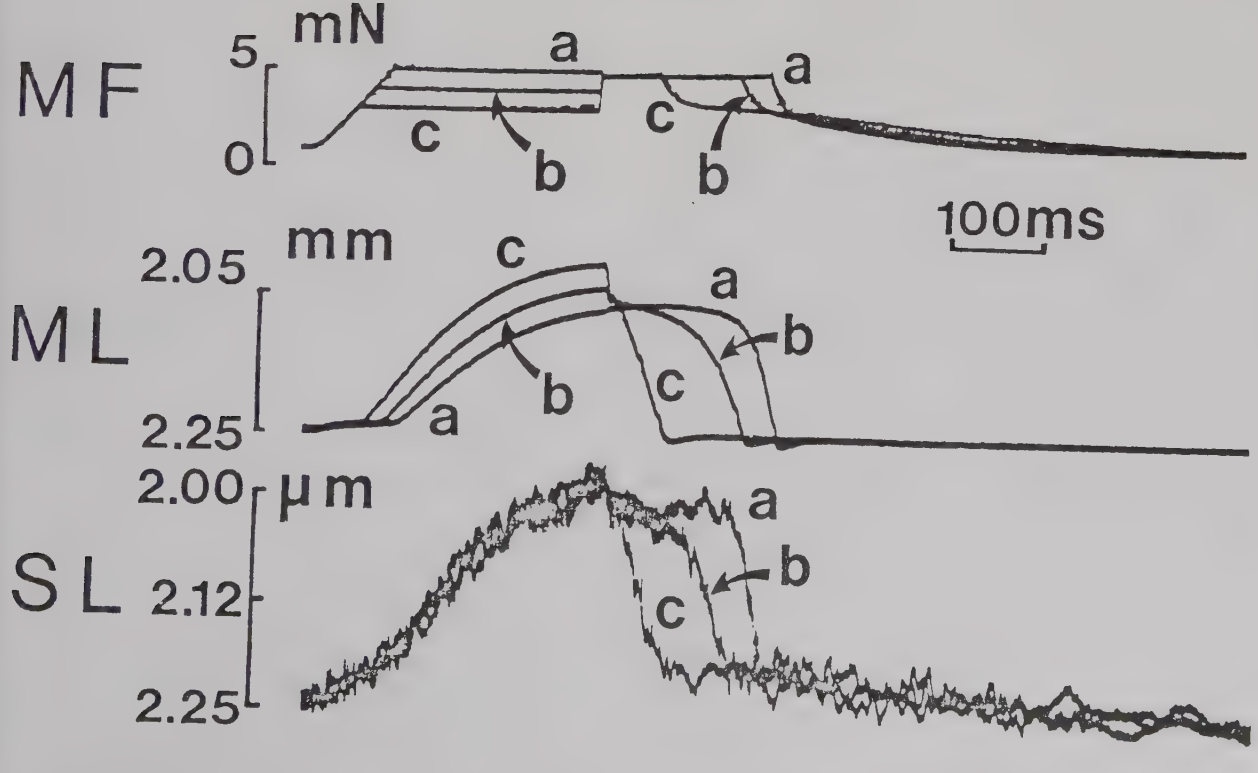

MF
5
0
mN
a
a
c
b
c
b
100ms
ML
2.05
2.25
mm
c
a
b
a
b
c
SL
2.00
2.12
2.25
μm
a
b
c

FIG.4

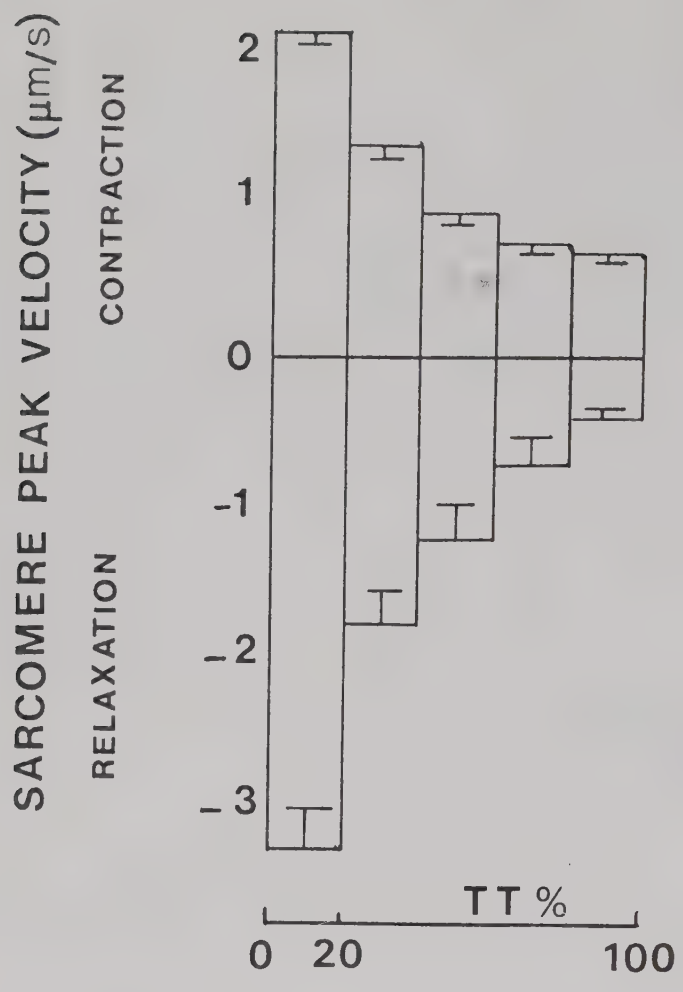

SARCOMERE PEAK VELOCITY (µm/s)
CONTRACTION
RELAXATION
2
1
0
-1
-2
-3
TT %
0
20
100

FIG.5

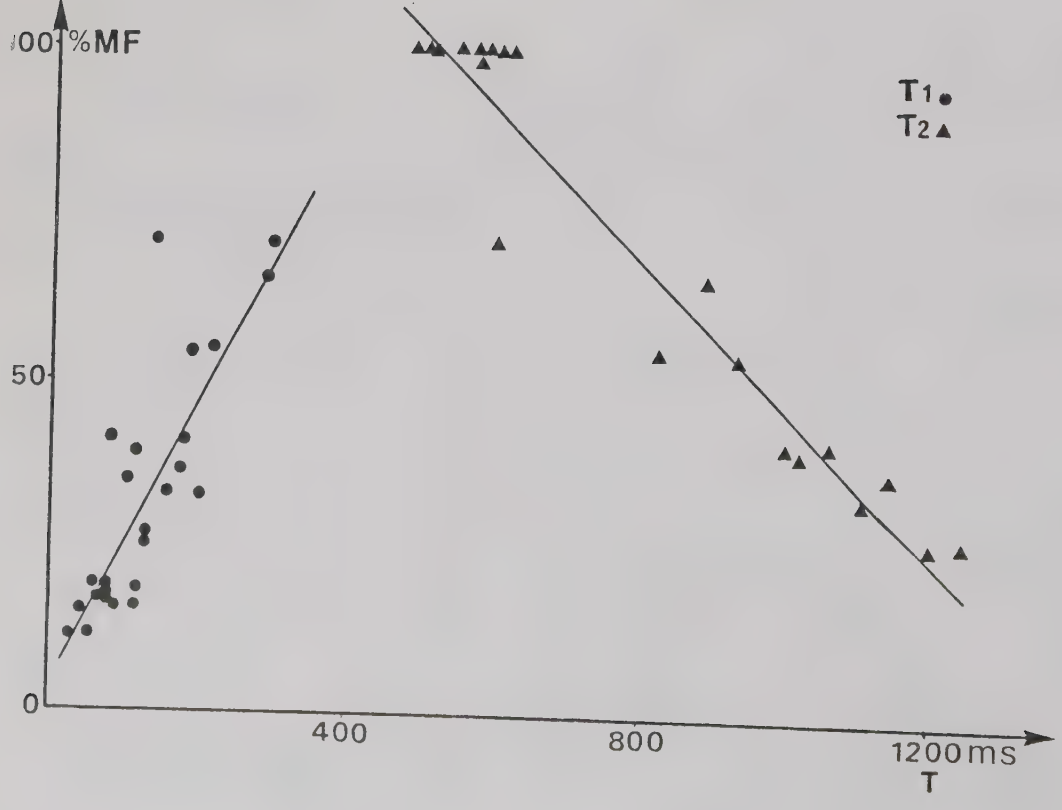

%MF
50
0
400
800
1200ms
T
T1
T2

FIG.6

Article sous presse dans la NOUVELLE PRESSE MEDICALE

# APPORT DU LASER A L'ETUDE DE LA MECANIQUE CARDIAQUE.

Lecarpentier Y., Martin J.L., Grillon G., Antonetti A. et Hatt P.Y.

I.N.S.E.R.M. U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes et Laboratoire d'Optique Appliquée, E.N.S.T.A., Ecole Polytechnique, 91120 Palaiseau.

Les tirés à part seront envoyés à : Dr. Lecarpentier Y., I.N.S.E.R.M. U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes.

INTRODUCTION

La physiologie cardiaque a bénéficié ces dernières années de l'introduction de techniques nouvelles utilisant des lasers. En mécanique cardiaque proprement dite, le laser permet de mesurer la longueur des sarcomères, unités anatomiques et fonctionnelles du myocarde. C'est grâce à sa structure très régulièrement striée que le tissu myocardique éclairé par un laser diffracte la lumière émise par celui-ci. La diffraction se fait selon des directions privilégiées, fonction de la longueur des sarcomères. Aux énergies utilisées, le laser n'interfère pas dans les évènements biochimiques intracellulaires impliqués dans les mécanismes de la contraction musculaire. De plus, le phénomène de diffraction persiste durant la contraction elle-même, ce qui implique que la régularité de la striation demeure intacte durant la phase de raccourcissement. Cela suppose un haut degré de synchronisme des mouvements des sarcomères. Le calcium joue dans le couplage excitation-contraction un rôle central : en effet, il pénètre en faible quantité dans la cellule à travers le sarcolemme durant le courant entrant lent et va déclencher une sortie importante de calcium hors du réticulum sarcoplasmique qui sert de réservoir calcique intracellulaire. Ce calcium va ensuite se fixer sur la troponine C. Cela induit un glissement des filaments d'actine entre les filaments de myosine et entraîne un raccourcissement des sarcomères (Fig. 2 A-B). La mesure du raccourcissement des sarcomères, en temps réel, a un double intérêt : (i) physiopathologique d'une part, car l'amplitude maximale de raccourcissement des sarcomères est liée au raccourcissement circonférentiel des fibres et donc à la fraction d'éjection ventriculaire, paramètre hémodynamique étudié en clinique ; (ii) pharmacologique et thérapeutique d'autre part, car le courant calcique lent module la quantité de calcium qui est extrudée du réticulum sarcoplasmique se comportant comme un amplificateur et qui participe à la genèse de la force contractile. L'intérêt thérapeutique provient du fait que les calcium-bloqueurs agissent spécifiquement sur le courant calcique lent et sont utilisés actuellement dans le traitement de l'insuffisance coronarienne.

## BREF RAPPEL PHYSIQUE SUR LA DIFFRACTION ET SUR LE PHENOMENE D'INTERFERENCES A ONDES MULTIPLES.

Lorsque des ondes lumineuses, issues d'une source O, éclairent un écran E percé d'une ouverture S de dimension suffisamment petite de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde (Fig. 1 A), il se produit un phénomène complexe de diffraction de la lumière. L'optique géométrique classique montre qu'il ne devrait y avoir de lumière que dans le cône BSC. En fait, on observe de la lumière dans une région cônique MSN beaucoup plus étendue. L'ouverture S (ou fente) se comporte comme une source ponctuelle émettant des ondes "diffractées" pratiquement sphériques centrées sur S. Les ondes incidentes et diffractées ont la même longueur d'onde $\lambda$, car la diffraction ne change pas la fréquence des vibrations.

Si l'on place n fentes identiques l'intensité lumineuse sera maximum dans les directions pour lesquelles la différence de marche $\delta = S_1P$ est égale à un nombre entier de fois la longueur d'onde utilisée (Fig. 1 B).

Ces directions privilégiées vérifient la condition $S_1P = S_1S_2 \sin \theta = Ls \sin \theta = \pm k\lambda$ dite "condition de Bragg" (Ls étant la distance séparant deux fentes consécutives et $\theta$ l'angle entre le rayon incident et le rayon diffracté). En dehors de ces directions privilégiées, il n'y a quasiment pas de lumière si le nombre de fentes est relativement grand (Fig. 1 C).

## LE MUSCLE STRIE ASSIMILE A UN RESEAU.

Le tissu musculaire strié, myocardique ou squelettique, se comporte vis-à-vis de la lumière comme une succession de fentes et donne donc lieu au phénomène de diffraction. Cela est dû à l'alternance très régulière des zones claires, transparentes à la lumière (bandes I isotropes) et de zones sombres opaques à celle-ci (bandes A anisotropes) composant les sarcomères (Fig. 2 A). Un sarcomère est

constitué d'une bande sombre entourée de deux demi-bandes claires de part et d'autre, et représente l'unité élémentaire de la structure striée du "réseau musculaire" (Fig. 2 A-B). Les phénomènes de diffraction apparaissent du fait que la dimension des bandes claires est du même ordre de grandeur que celle de la longueur d'onde incidente. Les bandes claires jouent alors le rôle de sources lumineuses en phase. Lorsqu'un laser, lumière monochromatique cohérente $\lambda$, éclaire perpendiculairement un muscle strié, myocardique ou squelettique, on observe une figure de diffraction qui se compose de franges lumineuses étroites et équidistantes, séparées par de larges intervalles obscurs. La figure 3 montre une figure de diffraction caractéristique du muscle squelettique où l'on distingue cinq franges brillantes équidistantes se détachant sur fond noir. Le tissu myocardique donne des aspects similaires, les franges étant cependant un peu moins fines. La figure de diffraction comporte une frange centrale ($k = 0$), correspondant à l'image géométrique de la source laser, puis une série de franges brillantes, équidistantes et symétriquement disposées de part et d'autre de la raie centrale d'ordre zéro. Dans le muscle squelettique, on observe habituellement des franges jusqu'à l'ordre 2 alors que dans le myocarde, on ne les observe guère au-delà de l'ordre 1. Cela est lié au fait que les fibres cardiaques sont distribuées selon de multiples directions alors que dans le muscle squelettique une direction préférentielle prédomine nettement.

Lorsque le muscle se contracte, les bandes I des sarcomères se raccourcissent et les bandes A demeurent de longueur constante. L'angle de diffraction $\theta$ se modifie selon la relation de Bragg $Ls = \frac{k\,\lambda}{\sin\theta}$, k étant l'ordre de la frange de diffraction, Ls la longueur du sarcomère. La mesure de la variation instantanée de l'angle de diffraction au cours de la contraction fournit, en appliquant la relation de Bragg, la variation instantanée de longueur des sarcomères. Cette méthode donne la valeur moyenne de la longueur de l'ensemble des sarcomères observés dans le champ éclairé par le laser. Trois principaux paramètres sont généralement calculés : (i) la variation du pas du réseau, en l'oc-

curence, la longueur instantanée du sarcomère, directement donnée par la formule de Bragg ; (ii) la variation d'intensité des franges, (iii) la dispersion de longueur des sarcomères. Les premier et troisième de ces paramètres seront plus spécialement étudiés ci-dessous.

De nombreuses études expérimentales de diffraction ont montré que la formule de Bragg rendrait compte de façon satisfaisante de la longueur des sarcomères, bien avant l'avènement des lasers. On a donc de longue date assimilé le muscle strié cardiaque ou squelettique à un ensemble de réseaux superposés et de pas identiques. Ranvier (18) le premier obtint un spectre de diffraction sur le muscle squelettique entier éclairé avec de la lumière blanche. Celui-ci observa au cours de la contraction une persistance et un déplacement des franges de diffraction et conclua que les sarcomères se déplaçaient de façon synchrone. En effet, un asynchronisme de raccourcissement des sarcomères aurait créé une dispersion de leur longueur, supprimant ainsi toute possibilité de diffraction de la lumière, le muscle n'étant plus dès lors assimilable à une succession de fentes identiques et équidistantes se comportant comme un réseau . Puis Sandow (21) montra que l'espacement des franges de diffraction obtenues à partir d'un réseau simple ou d'une superposition de plusieurs réseau de pas identique, avait même valeur. Buchtal et Knappeis (1) calculèrent que le pas du réseau complexe constitué par le muscle entier ne différait pas de celui d'une fibre musculaire isolée unique. Le muscle se comporte donc comme un ensemble de réseaux élémentaires identiques et superposés dont les variations de pas sont synchrones.

LA DIFFRACTION : METHODE PRECISE DE MESURE DE LA LONGUEUR DES SARCOMERES

L'ensemble des auteurs ayant utilisé des sources lumineuses polychromatiques, et plus récemment des sources laser monochromatiques s'accorde à considérer l'espacement des bandes de diffraction comme un index précis de mesure de la longueur des sarcomères. Cela fut vérifié chronologiquement dans le muscle squelettique (1, 2, 3, 4, 14, 15, 21, 22), puis dans le muscle cardiaque (9, 13, 17). La précision de la mesure est d'environ 50 Å

dans la fibre squelettique isolée (2). Dans le tissu cardiaque, la précision est moins bonne et limitée par un certain degré de dispersion de la longueur des sarcomères.

. Au repos

La longueur moyenne des sarcomères mesurée par diffraction laser sur des cellules cardiaques isolées in vitro par dissociation enzymatique est de $1,93 \mu \pm 0,10$, au repos (8). Elle ne varie pas avec la concentration externe de calcium. On retrouve la même valeur sur le muscle cardiaque entier, non préchargé c'est-à-dire non soumis à un étirement initial par une charge externe. Cela tient à ce que des éléments élastiques tendent à rétablir et à maintenir la longueur du sarcomère à 1,9 µ, en l'absence de toute contrainte externe. Lorsqu'on étire passivement un muscle, en le préchargeant la longueur des sarcomères varie linéairement avec celle du muscle entier. Cela a été observé dans le muscle squelettique entier (14, 21), et dans le tissu cardiaque (9, 13). Cette linéarité est importante car elle implique que les variations passives de longueurs du muscle entier sont distribuées uniformément à l'ensemble des sarcomères le long du muscle. Cela implique aussi que les constantes des éléments élastiques exponentiels en série et en parallèle par rapport aux sarcomères aient même valeur.

. Lors de la contraction isométrique

Ranvier (18) a montré que le "réseau musculaire" variait de façon homogène durant la phase de raccourcissement : "le muscle.. en activité et dans tous les états intermédiaires entre le repos complet et la contraction la plus énergique, donne toujours des spectres". Lors d'une contraction isométrique durant laquelle le muscle entier développe de la tension sans raccourcissement, on observe cependant un certain raccourcissement interne des sarcomères : celui-ci représente 10 % de la longueur initiale des sarcomères dans le muscle squelettique entier (22), et 2 % (15) à 7 % (2) dans la fibre squelettique isolée. Dans le muscle cardiaque, ce raccourcissement interne des sarcomères lors d'une contraction isométrique se fait au détriment de l'allongement des régions tendineuses très compliantes, situées aux extrémités de

la préparation (9, 17) et est d'environ 7 à 10 %. Enfin, la mesure de la longueur des sarcomères par diffraction laser, à diverses concentrations de calcium aide à une meilleure compréhension du mécanisme de Frank-Starling, bien que de nombreux points demeurent discutés (5, 7).

. Lors d'une contraction isotonique

Lorsque le muscle est soumis à une charge totale très légère, les sarcomères de muscle squelettique se raccourcissent d'environ 20 % de leur longueur initiale (22). Dans des conditions de charge analogues, le pourcentage de raccourcissement des sarcomères myocardiques est du même ordre de grandeur. Lorsque le muscle myocardique se contracte à charge nulle, la longueur du sarcomère diminue jusqu'à mesurer 1,6 µ au maximum de la phase de raccourcissement (8, 17). A cette longueur, les stries Z viennent buter contre l'extrémité des filaments de myosine, et les bandes claires tendent à disparaître (Fig. 2 A et B).

La vitesse de raccourcissement des sarcomères varie linéairement avec leur longueur instantanée. Lorsque celle-ci augmente de 1,7 à 2,1 µ, la vitesse augmente de 1 à 10 µ/s. Cette relation est encore observée lorsque la longueur initiale change, et est donc indépendante de la précharge (17).

La vitesse de raccourcissement des sarcomères dépend aussi de la concentration externe de calcium $[Ca^{2+}]_o$, et est fonction croissante de celle-ci ; le maximum de vitesse atteint respectivement 3,7 µ/s à $[Ca^{2+}]_o$ = 0,5 mM et 9,1 µ/s à $[Ca^{2+}]_o$ = 1 mM (8). En résumé, la vitesse instantanée de raccourcissement des sarcomères est fonction de leur longueur instantanée, mais aussi de la charge externe imposée au muscle et de la concentration externe de calcium $[Ca^{2+}]_o$.

ETUDE DE LA DISPERSION

Sandow (22) a montré que le spectre de diffraction restait presque aussi étroit et net lors de la contraction qu'au repos. Ceci témoigne d'un haut degré de synchronisme de mouvement de l'ensemble des sarcomères. En effet, un asynchronisme de contrac-

tion tendrait à élargir les franges de diffraction, voire même à supprimer la visibilité de ces franges de diffraction. Le calcul de la dispersion de la longueur des sarcomères est basé sur la largeur des franges de diffraction (11). La dispersion tient au fait que les franges de diffraction proviennent de l'interférence de la lumière par de nombreux sarcomères de longueurs légèrement différentes. Trois paramètres sont habituellement calculés pour l'évaluer : la largeur de la frange de diffraction, d'ordre k, la largeur à mi-hauteur du pic d'intensité de cette frange, le pourcentage de dispersion D = (W/PD) 100 (où W représente la largeur de la bande d'ordre k et PD l'espace inter-frange). Ces trois paramètres varient de façon parallèle. La dispersion moyenne (D) des sarcomères au repos est d'environ 11 % dans le muscle squelettique entier (6) et de 1 à 3 % dans la fibre squelettique isolée (6, 11, 15). Les franges de diffraction d'une fibre isolée sont beaucoup plus fines et marquées que celles produites par le muscle entier (1, 21). La dispersion augmente donc modérément avec le nombre de fibres musculaires. Dans la cellule cardiaque isolée, la dispersion au repos est d'environ 4 % (8). Au cours de la contraction, la dispersion ne change guère par rapport à sa valeur de repos, aussi bien dans le muscle squelettique entier (14), que dans la fibre isolée (3, 6, 15). Dans le myocyte isolé, la largeur des franges reste étroite au cours du raccourcissement, ce qui suppose un mouvement synchrone et homogène de l'ensemble des sarcomères.

Récemment Pollack et col. (16) ont montré que le raccourcissement des sarcomères se faisait selon un aspect en "marches d'escalier", avec des plateaux d'une dizaine de millisecondes durant lesquelles les sarcomères ne se raccourcissaient pas. Ces plateaux peuvent être expliqués par l'agencement de couches voisines de sarcomères dont la longueur est homogène au sein d'une même couche mais présente une faible différence d'une couche à l'autre (20). Cette distribution discrète de longueur des sarcomères d'une couche à l'autre témoigne d'une dispersion de longueur des sarcomères répartie non plus selon la longueur mais selon l'épaisseur du muscle (19, 20).

## CONCLUSION

Les lasers permettent actuellement une mesure extrêmement précise de la longueur des sarcomères durant la phase de raccourcissement. La persistance des franges de diffraction durant la contraction atteste du haut synchronisme des mouvements des sarcomères au sein d'un même myocyte mais aussi d'un myocyte à l'autre. Ces techniques actuellement utilisées au Laboratoire d'Optique Appliquée E.N.S.T.A., Ecole Polytechnique, permettent d'étudier les phases de contraction et de relaxation à l'échelle sub-cellulaire, dans du myocarde normal mais aussi pathologique (10). Une plus large application de ces techniques permettra d'apprécier les effets inotropes sur le sarcomère de divers médicaments utilisés de nos jours en cardiologie, en particulier les calcium-bloqueurs, beta-bloquants et autres agents inotropes nouveaux. Enfin, la mise au point récente de techniquesde spectroscopie résolue dans le temps, utilisant des lasers impulsionnels pico et femtosecondes (12), laisse envisager la possibilité d'étudier les modifications conformationnelles des protéines contractiles sur du tissu cardiaque vivant.

REFERENCES

1. BUCHTHAL, F. and KNAPPEIS, G.G. - Diffraction spectra and minute structure of the cross-straited muscle fibre. Skandinav. Archiv., 1940, 83 : 281-307.

2. CLEWORTH, D.R. and EDMAN, K.A.P. - Laser diffraction studies on single skeletal muscle fibers. Science, 1969, 163 : 296-29

3. CLEWORTH, D.R. and EDMAN, K.A.P. - Changes in sarcomere length during isometric tension development in frog skeletal muscle. J. Physiol. (Lond.), 1972, 227 : 1-17.

4. FUJIME, S. - Optical diffraction study of muscle fibers. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 379 : 227-238.

5. GORDON, A.M. and POLLACK, G.H. - Effects of calcium on the sarcomere length-tension relation in rat cardiac muscle. Implications for the Frank-Starling mechanism. Circ. Res., 1980, 47 : 610-619.

6. KAWAI, M. and KUNTZ, I.D. - Optical diffraction studies of muscle fibers. Biophys. J., 1973, 13 : 857-876.

7. KEURS ter, H.E.D.J., RIJNSBURGER, W.H., van HEUNINGEN, R. and NAGELSMIT, M.J. - Tension development and sarcomere length in rat cardiac trabeculae. Evidence of length-dependent activatio n Circ. Res., 1980, 46 : 703-714.

8. KRUEGER, J.W., FORLETTI, D. and WITTENBERG, B.A. - Uniform sarcomere shortening behavior in isolated cardiac muscle cells J. Gen. Physiol., 1980, 76 : 587-607.

9. KRUEGER, J.W. and POLLACK, G.H. - Myocardial sarcomere dynamics during isometric contraction. J. Physiol. (Lond.), 1975, 251 : 627-643.

10. LECARPENTIER, Y., MARTIN, J.L., GASTINEAU, P. and HATT, P.Y. - Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure. Am. J. Physiol., 1982, 242 : H855-H861.

11. MARIKHIN, V.A. and MYASNIKOVA, L.P. - "Light diffraction on the muscle fibres. I. Analysis of the geometrical pattern of diffraction". Tsitologiya, 1970, 12 : 1231-1236.

12. MARTIN, J.L., MIGUS, A., POYART, C., LECARPENTIER, Y., ASTIER, R. and ANTONETTI, A. - Femtosecond photolysis of CO-ligated protoheme and hemoproteins : appearance of deoxy species with a 350-fsec time constant. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1983, 80.

13. NASSAR, R., MANRING, A. and JOHNSON, E.A. - Light diffraction of cardiac muscle : sarcomere motion during contraction, pp. 57-82. In The Physiological Basis of Starling's Law of the Heart, Porter, R. and Fitzsimons, D.W., Eds., Associated Scientific Publishers Elsevier, 1974, Amsterdam.

14. PAOLINI, P.J. and ROOS, K.P. - Length-dependent optical diffraction pattern changes in frog sartorius muscle. Physiol. Chem. & Physics., 1975, 7 : 235-254.

15. PAOLINI, P.J., ROOS, K.P. and BASKIN, R.J. - Light diffraction studies of sarcomere dynamics in single skeletal muscle fibers. Biophys. J., 1977, 20 : 221-232.

16. POLLACK, G.H., IWAZUMI, T., KEURS ter, H.E.D.J. and SHIBATA, E.F. - Sarcomere shortening in striated muscle occurs in stepwise fashion. Nature, 1977, 268 : 557-559.

17. POLLACK, G.H. and KRUEGER, J.W. - Sarcomere dynamics in intact cardiac muscle. Eur. J. Cardiol., 1976, 4 (suppl.) : 53-65.

18. RANVIER, L. - Du spectre produit par les muscles striés. Archiv. Physiol., 1874, 2ème série I : 774-780.

19. RÜDEL, R. and ZITE-FERENCZY, F. - Interpretation of light diffraction by cross-striated muscle as Bragg reflexion of light by the lattice of contractile proteins. J. Physiol. (Lond.), 1979, 290 : 317-330.

20. RÜDEL, R. and ZITE-FERENCZY, F. - Do laser diffraction studies on striated muscle indicate stepwise sarcomere shortening ? Nature, 1979, 278 : 573-575.

21. SANDOW, A. - Diffraction patterns of the frog sartorius and sarcomere behavior under stretch. J. Cell. Comp. Physiol., 1936, 9 : 37-55.

22. SANDOW, A. - Diffraction patterns of the frog sartorius and sarcomere behavior during contraction. J. Cell. Comp. Physiol., 1936, 9 : 55-75.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1

A : une ouverture S de dimension de même ordre de grandeur que la longueur d'onde $\lambda$ de la source lumineuse O provoque une diffraction de la lumière dans le cône MSN.

B : deux fentes $S_1$ et $S_2$ de même dimension sont éclairées par une vibration monochromatique incidente Vi (source laser He-Ne : $\lambda$ = 633 nm). La lumière diffractée par ces deux fentes crée un champ d'interférence. Un maximum de lumière est observé lorsque la différence de marche $\delta = S_1P$ entre les vibrations diffractées (Vd) est égale à un multiple entier de la longueur d'onde $\lambda$ de la vibration incidente (Vi) soit $\delta = \pm k\lambda = S_1S_2 \sin \theta$.

C : l'ordre zéro (k = 0) correspond à la direction du laser normale à celle du muscle ; dans ce cas $\delta = 0$ ; l'ordre 1 (k = 1) correspond à la direction où $\delta = \lambda = S_1P = S_1S_2 \sin \theta$; l'ordre 2 (k = 2) correspond à la direction où $\delta = 2\lambda$; $S_1S_2 = S_2S_3$ = Ls : la longueur du sarcomère.

Figure 2

A : détail d'un sarcomère observé en microscopie électronique

B : représentation schématique du sarcomère, zone comprise entre deux lignes Z. Les bandes sombres sont constituées de filaments épais de myosine. Les filaments fins d'actine constituent les bandes claires.

C : un laser L éclaire perpendiculairement une fine trabécule musculaire M, composée de nombreux sarcomères en série. Les bandes claires des sarcomères se comportent comme les fentes de la Figure 1. Si le laser éclaire une plage importante de sarcomères (100 à 300 µm) il se produit de nombreux champs d'interférence qui se superposent et dont il résulte des maxima de lumière selon des directions déterminées. Les franges de diffraction sont symétriques par rapport à la frange d'ordre 0, et leur intensité diminue lorsque leur indice d'ordre augmente. Au repos, les franges sont immobiles et l'angle $\theta$ est lié simplement à la longueur

du sarcomère par la relation $Ls = \lambda/\sin \Theta$, voir Fig. 1 C (ordre 1). Lors de la phase de contraction, l'angle $\Theta$ et par suite l'espace interfrange augmentent. Chaque frange d'ordre différent de zéro s'écarte de la frange zéro et diminue d'intensité.

Figure 3

Franges de diffraction obtenue lorsqu'on éclaire du tissu musculaire strié avec un laser He-Ne. On observe cinq franges brillantes et équidistantes, leur espacement étant inversement proportionnel à la longueur des sarcomères. (Photographie : Philippe Plailly).

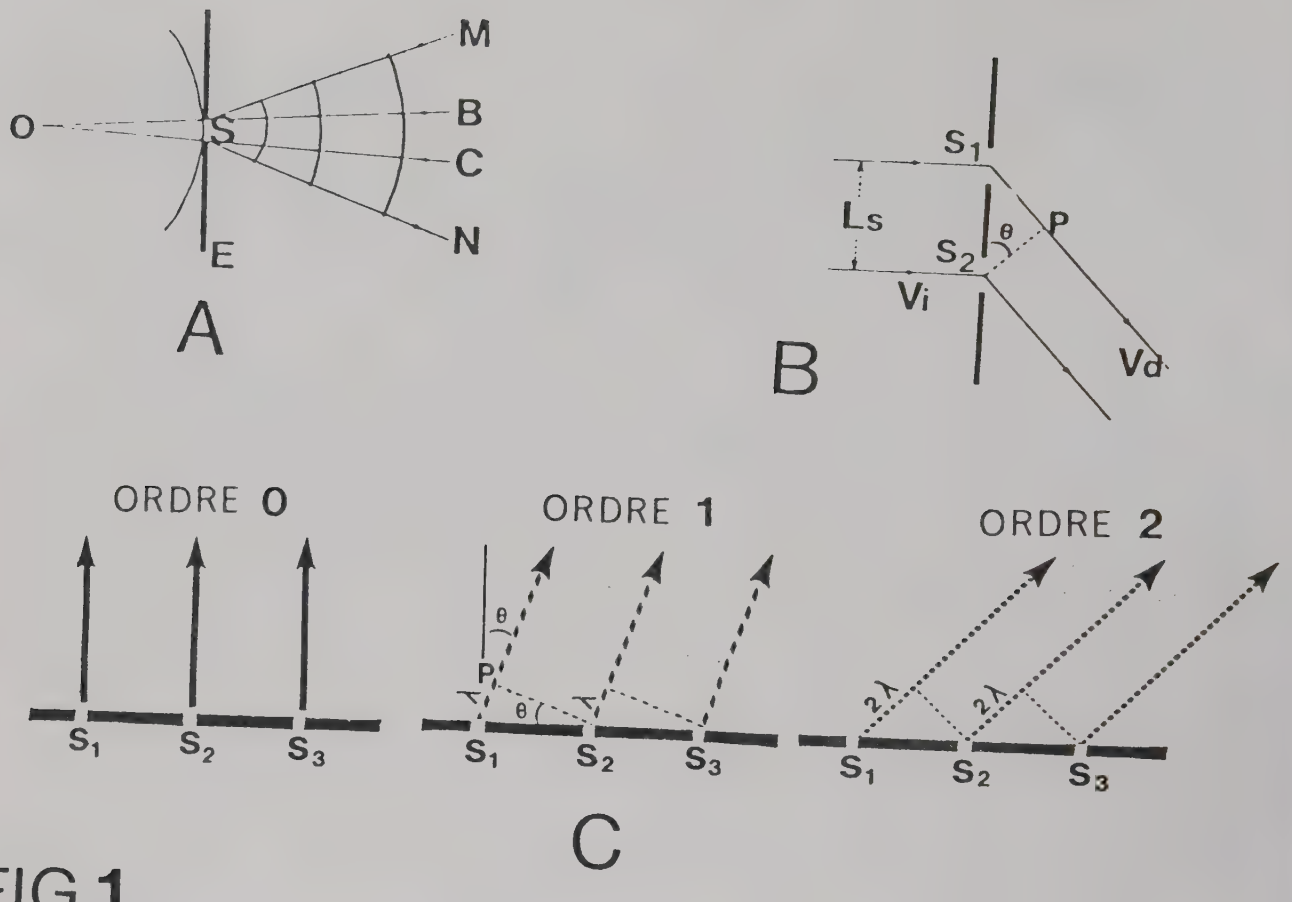

O
S
M
B
C
N
E
A
S1
Ls
S2
θ
P
Vi
Vd
B
ORDRE 0
ORDRE 1
ORDRE 2
S1
S2
S3
P
θ
λ
2λ
C

FIG.1

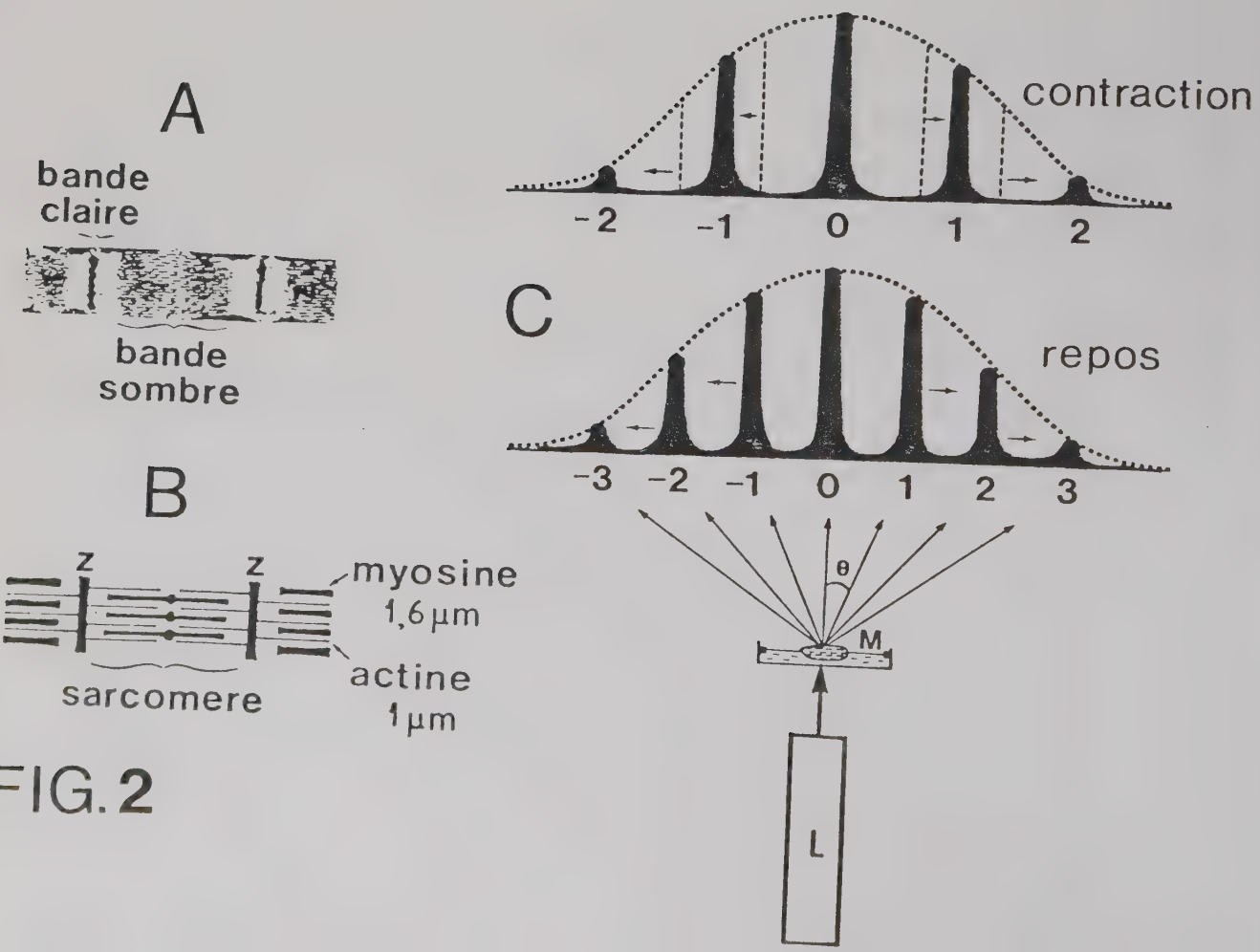

A
bande claire
bande sombre
B
Z
Z
myosine 1,6µm
actine 1µm
sarcomere
contraction
-2
-1
0
1
2
C
repos
-3
-2
-1
0
1
2
3
θ
M
L

FIG.2

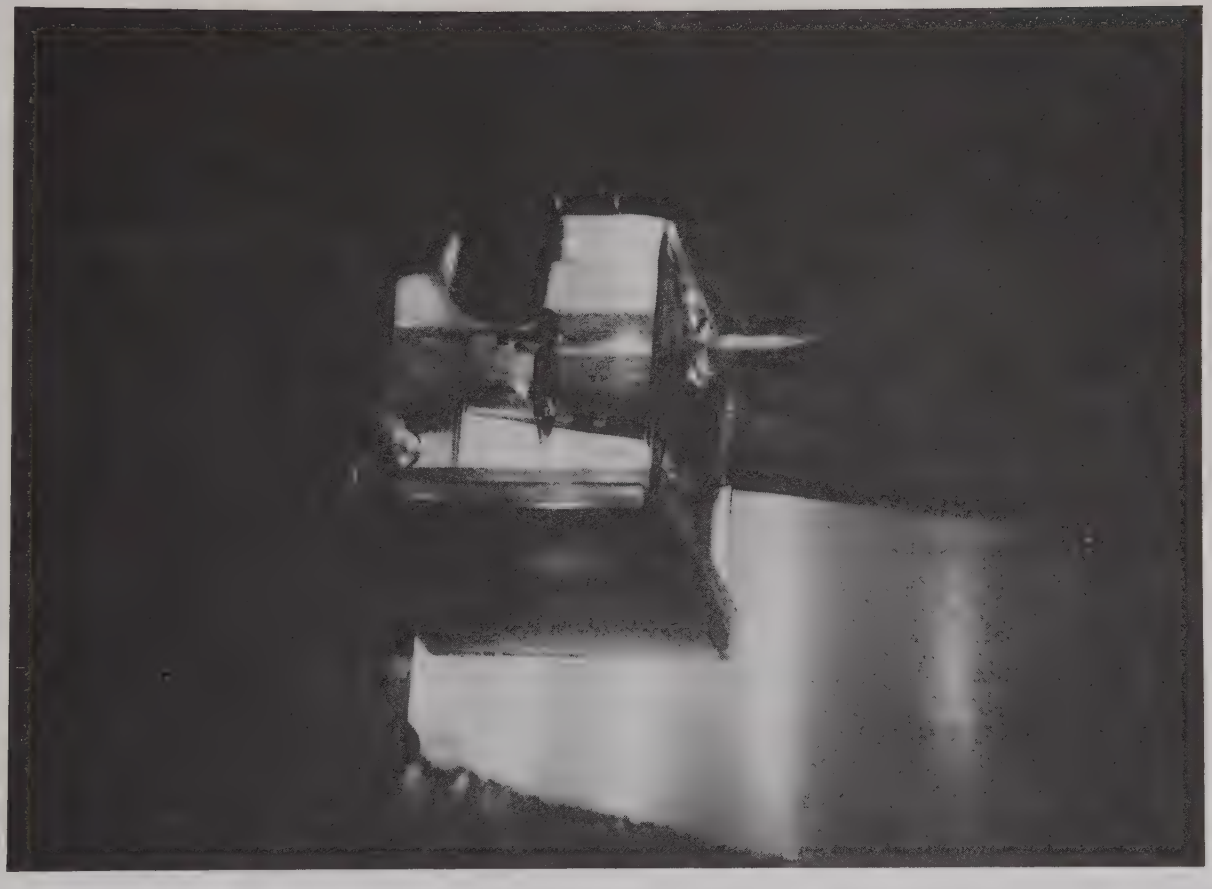


FIG.3

From : ADVANCES IN MYOCARDIOLOGY, Vol. 4
Edited by E. Chazov, V. Saks, and G. Rona
(Plenum Publishing Corporation, 1983)
pp. 87-95)

# Force–Velocity–Length Relationship during Cardiac Hypertrophy

## Time Course of Activation

Y. Lecarpentier, P. Gastineau, and P. Y. Hatt

I.N.S.E.R.M. U2
Hôpital Léon Bernard
94450 Limeil-Brévannes, France

J. L. Martin

E.N.S.T.A., Ecole Polytechnique
91120 Palaiseau, France

**Abstract.** Basic mechanical properties observed during cardiac hypertrophy were studied in left ventricular rat papillary muscles after exposure to chronic pressure and/or volume overloading. It is always possible, during such overloading conditions, to define the level of contractility in terms of a force–velocity–length (F–V–L) relationship regardless of time and initial length. Thus, during a determined period of the contraction phase and for a given total load, shortening velocity remained an univocal time-invariant function of shortening length, involving a time-independent maximum intensity of activation. The onset of this precise phase was reached relatively soon after stimulus. The time-independent F–V–L relation was observed both in controls and in hypertrophied heart muscles, whatever the degree and the type of induced hypertrophy, and even during the latest phases of congestive heart failure.

In the last 10 years, morphology, mechanics, and biochemistry have demonstrated many myocardial changes during the development of cardiac hypertrophy. Abnormalities in mechanical parameters such as shortening velocity or isometric tension have been found (2,25,26). But little is known about the tridimensional force–velocity–length (F–V–L) relationship and the time course of activation during chronic cardiac overloading. In normal heart muscle, instantaneous measurements of the four main variables, force, shortening velocity, shortening length, and time have led to a definition of the contractile state. First, a relationship was shown to exist between the shortening velocity and the shortening extent, regardless of initial length (22). Cardiac contractility was then defined as the time- and initial length-independent part of the F–V–L diagram (5). Any change in contractility obtained after various inotropic effects was found to be the result of a shift in the F–V–L surface (22). This relationship characterizes the mechanical performance of heart muscle and involves a maximum time course of active state when the muscle is operating on the F–V–L surface (24). Any change

in maximum intensity of the activation processes is implicit in the shift of the force–velocity relationship brought about by inotropic effects (1,20,21).

Load-clamp techniques (5,7) have contributed to an understanding of further basic mechanical properties in normal heart muscle: during an afterloaded isotonic twitch (1) there is a precise stage during the contraction phase when the instantaneous shortening velocity is exclusively determined by the instantaneous extent of shortening, and (2) when an abrupt load clamp is applied at a given final total load, the instantaneous shortening velocity adapts almost immediately to the extent of shortening. These two properties depend neither on initial length nor on the moment when the load clamp is applied during this particular stage.

Our aim was to determine whether properties 1 and 2, observed in normal mammalian papillary muscle, were still persistent during cardiac hypertrophy and congestive heart failure. Quantitative parameters were deliberately excluded from this concise study.

We have found it was possible, using chronic overloading conditions, to define the level of contractility in terms of the time- and initial length-invariant relationship. We shall see that these basic mechanical properties did not disappear whatever the type and degree of chronic ventricular overloading and even in terminal stages of congestive heart failure, although quantitative modifications in overall mechanical behavior were found.

## MATERIALS AND METHODS

This study was carried out on left ventricular papillary muscles from Wistar rats, whose hearts were subjected to different types of pressure and volume overloading, resulting in various degrees of cardiac hypertrophy. Heart weight, in many cases, attained two to three times that of normal rats; this is comparable to human cardiac hypertrophy. Some of the rats even suffered from congestive heart failure with dyspnea, pulmonary and subcutaneous edema, and hepatic congestion at the moment of sacrifice.

Five groups of Wistar rats were studied. Group 1 were controls ($N$ = 16; heart weight: 0.85 ± 0.03 g). Group 2: aortic insufficiency (AI) was induced by a lesion of one sigmoid aortic valve with a catheter introduced into the right carotid artery ($N$ = 10; heart weight: 1.91 ± 0.10 g). Group 3 had an aortocaval fistula (ACF): a communication between the abdominal aorta (between the left renal artery and aortic bifurcation) and inferior vena cava was induced as previously described (13) ($N$ = 12; heart weight: 1.68 ± 0.08 g). Group 4: aortic stenosis (AS) was obtained with subtotal constriction of the abdominal aorta (16) ($N$ = 9; heart weight: 1.25 ± 0.08 g). Group 5 had AS and AI: double pressure and volume overloading was successively induced in the same rat with a 15-day interval between the two operations ($N$ = 4; heart weight: 2.26 ± 0.15 g).

Papillary muscles were quickly removed from the left ventricle and

vertically suspended in a bathing solution containing (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, $KH_2PO_4$ 1.1, $NaHCO_3$ 24, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.5, and glucose 4.5. The preparations were electrically stimulated with rectangular pulses of 5 msec duration just above threshold by means of two platinum electrodes. Frequency of stimulation was 6 beats/min. The solution was bubbled with 95% $O_2$ and 5% $CO_2$ and maintained at pH 7.4 and 29°C. After a 1-hr stabilization period at $L_{max}$, the muscles recovered optimal mechanical performance. The force transducer system and the whole electronic device have been described elsewhere (6).

## RESULTS

The experiments described in Figures 1, 2, and 3 show the mechanical behavior of different twitches at the same final total load. In the first experiment (Figure 1), preload was modified from one twitch to another by adapting the afterload in such a way that total load was the same for each

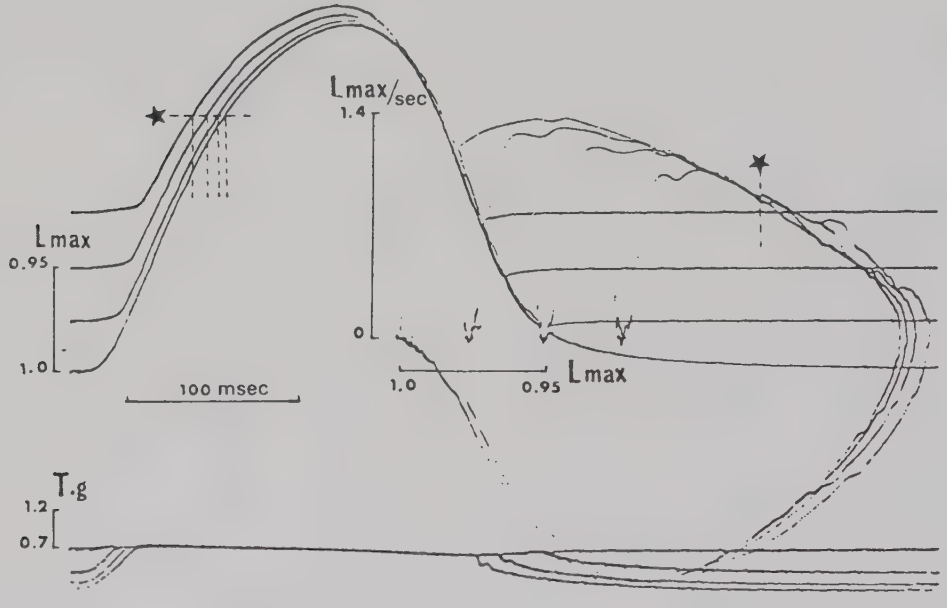



Figure 1. On the left: shortening length-vs.-time and force-vs.-time curves. On the right: superimposed velocity–length phase plane diagram. Four twitches have been shown with different initial lengths ($L_{max}$; $-2.5\%$ $L_{max}$; $-5\%$ $L_{max}$; $-7.5\%$ $L_{max}$) but with total load kept constant (0.7 g). Although the shortening length-vs.-time curves were dissociated, velocity–length phase planes presented a common pathway over a large part of the contraction phase. So shortening velocity as a function of length is independent of initial length and time during this particular stage of the contraction phase. The papillary muscle used in this experiment was removed from a left ventricle overloaded for 1 year by an aortocaval fistula; heart weight, 1.7 g; preload at $L_{max}$, 0.7 g.

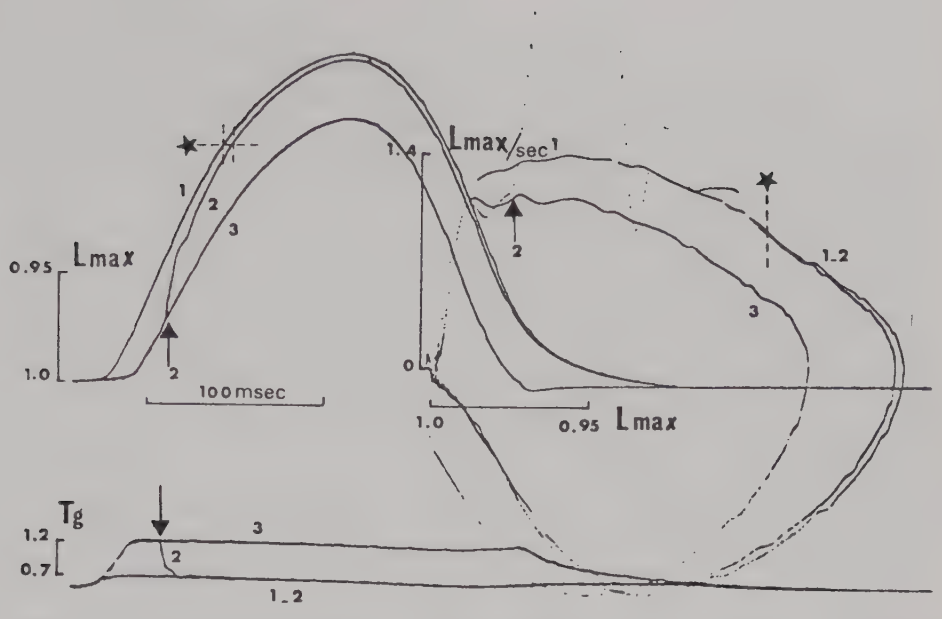



Figure 2. Same general arrangement and same papillary muscle as in Figure 1. The initial length was $L_{max}$ in twitches 1, 2, and 3. Twitch 1 was only preloaded at 0.7 g. In twitch 3, preload was 0.7 g, and total load 1.2 g. Twitch 2 was preloaded at 0.7 g and began to contract as in twitch 3 and was abruptly load clamped to 0.7 g (arrow). After a transient oscillation period, twitches 1 and 2 were dissociated on the length-vs.-time curves and showed a common pathway on the phase-plane traces. So shortening velocity adapted quasi-instantaneously to shortening extent, irrespective of time.

four twitches. In the second experiment (Figure 2), preload was constant and afterload variable; after an abrupt load clamp, however, the same total load was obtained. The third experiment (Figure 3) simultaneously combined the procedures used in Figures 1 and 2. We examined mechanical properties only during the contraction phase; the relaxation phase was not taken into account.

In each figure, the same general arrangement was used: shortening length vs. time and force vs. time on the left and velocity–length phase plane on the right.

In Figure 1, four twitches were shown with the same total load (0.7 g) and with different initial lengths ($L_{max}$; $-2.5\%$ $L_{max}$; $-5\%$ $L_{max}$; $-7.5\%$ $L_{max}$). Analysis of the velocity–length phase plane revealed three successive stages a, b, and c. Stage b corresponded to the common pathway of the traces on the velocity–length phase plane. During this particular stage of the contraction phase, instantaneous shortening velocity was entirely determined by instantaneous shortening length regardless of initial length. Moreover, a given extent of shortening occurred at different times when initial length was changed. Thus, during stage b, instantaneous velocity was independent of time and preload. This means that whenever a given degree

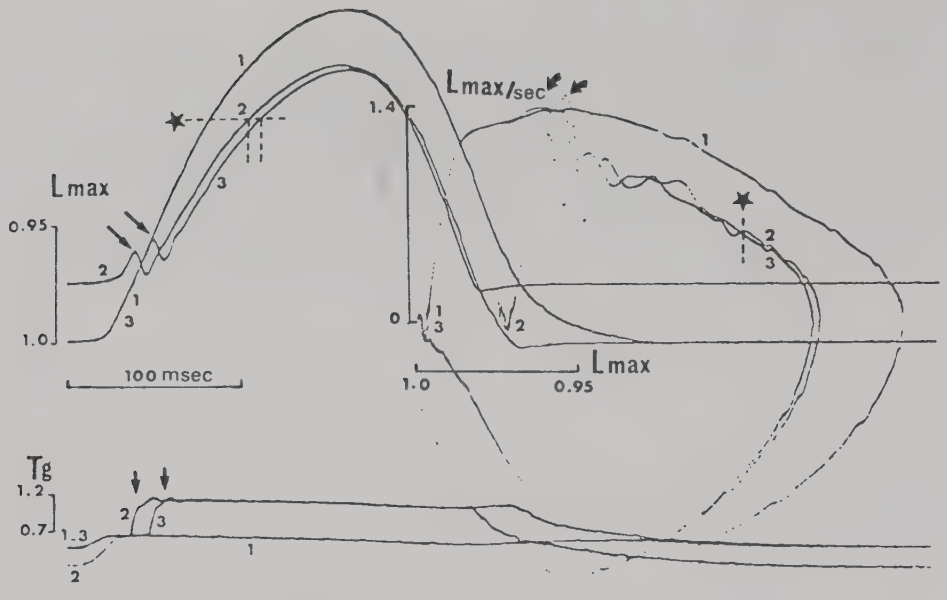



Figure 3. Same general arrangement and same papillary muscle as in Figure 1. The initial length was $L_{max}$ in twitches 1 and 3 and $-2.5\%$ $L_{max}$ in twitch 2. Twitches 2 and 3 were abruptly load clamped from 0.7 to 1.2 g at two different moments (arrows). After a brief oscillation period, velocity–length phase planes of twitches 2 and 3 coincided, although shortening length-vs.-time curves were dissociated. So shortening velocity is a time- and initial length-invariant function of shortening length.

of shortening occurs and for a constant total load, one and only one instantaneous shortening velocity will correspond to it. This univocal velocity–length function characterizes the level of contractility and implies a time-invariant course of active state during stage b.

Stage a in Figure 1 corresponded to the initial part of the twitches, from stimulus to the onset of stage b. After peak velocity, traces of the four phase planes remained dissociated because a given shortening extent was reached at different velocities. So, during stage a, a time-dependent and nonunivocal function linked instantaneous shortening velocity to shortening extent. This implies a time-variant intensity of active state until the onset of the common pathway on the phase plane. The end of stage a occurred when the activation processes leveled off. Stage c in Figure 1 constituted the third part of contraction when the velocity–length phase planes were dissociated again. Time and initial length influenced the relationship between shortening length and shortening velocity, as a given shortening velocity corresponded to several extents of shortening. This nonunivocal function suggests that intensity of active state varies during stage c.

In all hypertrophied hearts, a specific stage b, characterizing the time-independent activation, was found. This mechanical behavior was observed in both normal and chronically overloaded muscles. This implies that intra-

cellular mechanisms governing the invariant time course activation of stage b are preserved during cardiac hypertrophy.

These results have been corroborated by means of complementary technique using load clamping (5) during the contraction phase. In Figure 2, twitch 2 began to contract isotonically with the same total load as that of twitch 3 and was abruptly clamped at the final total load of twitch 1. After a brief oscillation period, the velocity–length phase planes of twitches 1 and 2 were merged, whereas traces of instantaneous shortening length versus time were distinct. For a given total load, the shortening velocity adapted quasi-instantaneously to the shortening extent, regardless of time. This result was not modified by changing either the moment when the load clamp was applied during the contraction phase or its amplitude. This suggests that activation (1) remains time invariant during the specific stage when shortening velocity is able to adapt univocally to shortening length, (2) is not modified by modifications of total load or by changes in length induced by the load clamp, and (3) has no memory of the loading conditions before the load clamp. These characteristics (5,24), previously found in normal heart muscle, remained true for all types and stages of cardiac hypertrophy in Wistar rats.

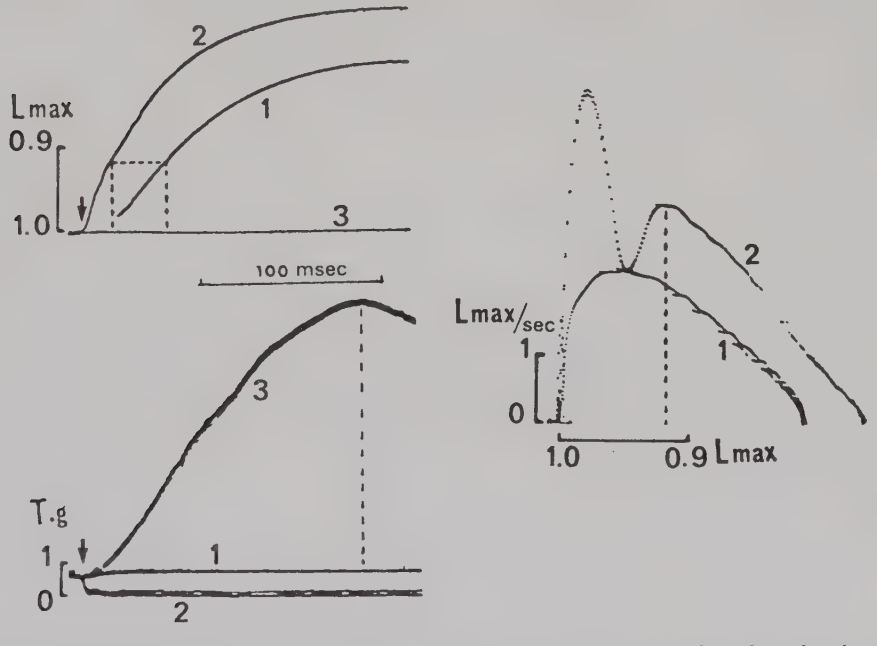



Figure 4. Same general arrangement as in Figure 1. Only the contraction phase has been shown. The heart muscle used in this experiment was overloaded for 2 months by aortic insufficiency (heart weight 1.4 g and preload at $L_{max}$ 0.8 g). Twitch 1 was only preloaded at 0.8 g. Twitch 2 was abruptly clamped to zero load just after stimulus. Maximum unloaded velocity occurred 25 msec after stimulus (17% of the time to peak tension).

Figure 3 combines the two experiments shown in Figures 1 and 2. Twitches 2 and 3, which began at two different initial lengths, were clamped at two different moments at the same final total load. After a brief oscillation period, traces of twitches 2 and 3 coincided on the velocity–length phase planes and were distinct on the length-vs.-time curves. Thus, for a given level of total load, shortening velocity was able to adapt univocally to shortening length. This quasi-instantaneous adaptation was time and initial length independent.

Another experimental procedure is shown in Figure 4. Twitch 1 was only preloaded, and twitch 3 contracted isometrically. Twitch 2 was abruptly clamped to zero load very soon after stimulus, and an adequate damping abbreviated the transient oscillation period. Maximum unloaded velocity was reached early in the contraction phase, about 25 msec after stimulus. Peaks of unloaded velocity and further courses of unloaded phase planes were found to be independent of initial length during cardiac hypertrophy. This result has previously been described in normal mammalian heart (5). The onset of the time-independent unloaded relationship began early at about 17% of the time to peak tension. Although the maximum value of unloaded velocity decreased during cardiac hypertrophy (19), the qualitative mechanical properties remained present. Values of $V_{max}$ were ($L_{max}$/sec): Controls, 2.65 ± 0.12; AI, 2.61 ± 0.16; ACF, 1.98 ± 0.17; AS, 1.64 ± 0.11; AS + AI, 1.13 ± 0.14.

## DISCUSSION

Stage b of the contraction phase characterizes the mechanical behavior of both normal and hypertrophied heart muscles. When total load is progressively incremented from preload until isometric tension, the whole range of stage b describes the specific time-invariant part of the tridimensional F–V–L surface which defines the level of contractility and the maximum activation of the muscle. This F–V–L relationship is globally lowered during chronic cardiac hypertrophy. Several abnormalities have been described during chronic pressure and volume overloading (10), both in membrane systems and in contractile apparatus. Activation appeared to be subject to quantitative changes; however, its time-invariant regulated part is maintained during stage b. A drop in the maximum level of constant activation may occur during cardiac hypertrophy as implied by the decreased maximum unloaded velocity (19).

Many authors have attempted to quantify the active state in striated muscle by mechanical measurements (17). The concept itself has been largely discussed (15) because the method used to measure it, the muscle length (27), and changes in length (3,12) may influence its intensity and time course. It has been found that shortening velocity in skeletal muscle increases very soon after stimulus and quickly attains a maximum value near $V_{max}$ (14).

Moreover, the active state has been shown to develop relatively slowly in heart muscle (4,11,23). Measured with the quick-release technique, it is fully developed after 35% of time to peak tension (24). The duration of its maximum intensity (24) represents approximately 65% of the time to peak tension.

On the other hand, the time to maximum unloaded velocity, measured by zero-load clamp, occurs soon after the latent period at about 15–20% of time to peak tension (5). This suggests that activation may rapidly attain its maximum value after stimulus. In accordance with these results, we have found that maximum unloaded velocity was attained early during the contraction phase, at about 17 to 25% of time to peak tension (see Figure 4).

Instantaneous adaptation of velocity to length was not verified when load clamps were applied later, during the third part of the contraction phase, because of a decrease in activation. Further time course of contraction and relaxation appeared markedly modified, and the force–velocity–length relationship became load and time dependent. Load sensitivity obtained at the end of the contraction phase and during the relaxation phase is specific to mammalian heart muscle (8,9) and implies an efficient sarcoplasmic reticulum (18). This mechanical property is not found in frog ventricular muscle which has a sparse sarcoplasmic reticulum. However, we have always observed during cardiac hypertrophy the load and time sensitivity of the last part of the contraction phase. This suggests that, in chronic pressure- and volume-overloading conditions, intracellular membraneous systems may still regulate the onset, the duration, and the end of stage b according to the general loading conditions.

## REFERENCES

1. Abbott, B. C., and Mommaerts, W. F. H. M. 1959. A study of inotropic mechanisms in the papillary muscle preparation. *J. Gen. Physiol.* 42:533–551.
2. Bing, O. H. L., Matsushita, S., Fanburg, B. L., and Levine, H. J. 1971. Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. *Circ. Res.* 28:234–245.
3. Brady, A. J. 1965. Time and displacement dependence of cardiac contractility: Problems in defining the active state and force–velocity relations. *Fed. Proc.* 24:1410–1420.
4. Brady, A. J. 1966. Onset of contractility in cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 184:560–580.
5. Brutsaert, D. L. 1974. The force–velocity–length–time interrelation of cardiac muscle. In: R. Porter, and D. W. Fitzsimons (eds.), *The Physiological Basis of Starling's Law of the Heart*, pp. 155–175. Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland, Amsterdam.
6. Brutsaert, D. L., and Claes, V. A. 1974. Onset of mechanical activation of mammalian heart muscle in calcium- and strontium-containing solutions. *Circ. Res.* 35:345–357.
7. Brutsaert, D. L., Claes, V. A., and Sonnenblick, E. H. 1971. Velocity of shortening of unloaded heart muscle and the length–tension relation. *Circ. Res.* 29:63–75.
8. Brutsaert, D. L., De Clerck, N. M., Goethals, M. A., and Housmans, P. R. 1978. Relaxation of ventricular cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 283:469–480.
9. Brutsaert, D. L., Housmans, P. R., and Goethals, M. A. 1980. Dual control of relaxation: Its role in the ventricular function in the mammalian heart. *Circ. Res.* 47:637–652.
10. Dhalla, N. S., Das, P. K., and Sharma, G. P. 1978. Subcellular basis of cardiac contractile failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10:363–385.

11. Edman, K. A. P., and Nilsson, E. 1968. Mechanical parameters of myocardial contraction studied at a constant length of the contractile element. *Acta Physiol. Scand.* 72:205–219.
12. Edman, K. A. P., and Nilsson, E. 1972. Relationships between force and velocity of shortening in rabbit papillary muscle. *Acta Physiol. Scand.* 85:488–500.
13. Hatt, P. Y., Rakusan, K., Gastineau, P., and Laplace, M. 1979. Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto–caval fistula in the rat). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11:989–998.
14. Hill, A. V. 1951. The transition from rest to full activity in muscle: The velocity of shortening. *Proc. R. Soc. Lond.* [*Biol.*] 138:329–338.
15. Jewell, B. R., and Wilkie, D. R. 1960. The mechanical properties of relaxing muscle. *J. Physiol.* (*Lond.*) 152:30–47.
16. Jouannot, P., and Hatt, P. Y. 1975. Rat myocardial mechanics during pressure-induced hypertrophy development and reversal. *Am. J. Physiol.* 229:355–364.
17. Julian, F. J., and Moss, R. L. 1976. The concept of active state in striated muscle. *Circ. Res.* 38:53–59.
18. Lecarpentier, Y. C., Chuck, L. H. S., Housmans, P. R., De Clerck, N. M., and Brutsaert, D. L. 1979. Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 237:H455–H460.
19. Lecarpentier, Y., Martin, J. L., Gastineau, P., and Hatt, P. Y. 1980. Mammalian heart mechanical properties during pressure and volume cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12(Suppl. 1):92.
20. Sonnenblick, E. H. 1962. Force–velocity relations in mammalian heart muscle. *Am. J. Physiol.* 202:931–939.
21. Sonnenblick, E. H. 1962. Implications of muscle mechanics in the heart. *Fed. Proc.* 21(Suppl.):975–990.
22. Sonnenblick, E. H. 1965. Instantaneous force–velocity–length determinants in the contraction of heart muscle. *Circ. Res.* 16:441–451.
23. Sonnenblick, E. H. 1967. Active state in heart muscle. Its delayed onset and modification by inotropic agents. *J. Gen. Physiol.* 50:661–676.
24. Sonnenblick, E. H., and Parmley, W. W. 1967. Active state in heart muscle: Force–velocity–length relations, and the variable onset and duration of maximum active state. In: D. I. Abramson (ed.), *Circulation in the Extremities*, pp. 65–83. Academic Press, London, New York.
25. Spann, J. F., Buccino, R. A., Sonnenblick, E. H., and Braunwald, E. 1967. Contractile state of cardiac muscle obtained from cats with experimentally produced ventricular hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* 21:341–354.
26. Spann, J. F., Covell, J. W., Eckberg, A. L., Sonnenblick, E. H., Ross, J., Jr., and Braunwald, E. 1972. Contractile performance of the hypertrophied and chronically failing cat ventricle. *Am. J. Physiol.* 223:1150–1157.
27. Taylor, S. R., and Rüdel, R. 1970. Striated muscle fibers: Inactivation of contraction induced by shortening. *Science* 167:882–884.

# Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle

YVES C. LECARPENTIER, LEONARD H. S. CHUCK, PHILIPPE R. HOUSMANS, NORA M. De CLERCK, AND DIRK L. BRUTSAERT
*Department of Physiology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium*

LECARPENTIER, YVES C., LEONARD H. S. CHUCK, PHILIPPE R. HOUSMANS, NORA M. DE CLERCK, AND DIRK L. BRUTSAERT. *Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle.* Am. J. Physiol. 237(4): H455–H460, 1979 or Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol. 6(4): H455–H460, 1979.—Relaxation of spontaneously contracting single rat cardiac cells with an effective sarcoplasmic reticulum was shown to be sensitive to load, as previously described for intact mammalian ventricular cardiac muscle. Caffeine and tetanic stimulation could modify load-dependent relaxation in intact papillary muscle from cat or rat into a load-insensitive relaxation. Although such load dependence was demonstrated to be normally absent in frog ventricular cardiac muscle, in the present study it could also be made moderately manifest under specific conditions, e.g., high calcium, low sodium, or ouabain. The appearance of load dependence during relaxation in cardiac muscle thus emphasizes the presence of an effective sarcoplasmic reticulum.

mammalian single cardiac cells; cardiac muscle of frog, cat, rat; calcium activation; sarcotubular system; caffeine

---

RELAXATION IN CARDIAC MUSCLE was shown to be governed either by the loading conditions or by the decay of activation (6, 7). Load-sensitive relaxation was observed in mammalian papillary muscle (7). However, the decay of the activating calcium ions determined relaxation in preparations with sparse sarcoplasmic reticulum, such as frog ventricular strips (32) and in single mammalian cardiac cells in which the sarcoplasmic reticulum was artificially destroyed (6). These results imply the presence of a functional sarcoplasmic reticulum (12, 13) for this load dependence to become manifest.

We have now observed load dependence of relaxation in spontaneously beating single mammalian cardiac cells and, under a variety of conditions, to some extent also in intact frog cardiac muscle. Yet, the load-dependent relaxation of mammalian papillary muscles could be converted into a load-insensitive relaxation by the addition of caffeine or by tetanization.

## METHODS

### *Single Mammalian Cardiac Cells*

Single cardiac cells were manually dissected from rat heart as previously described (9). Two kinds of preparations were used: *1)* cells ($n$ = 28) pretreated for about 40 min with high EGTA (ethylene glycol-bis ($\beta$-aminoethyl ether)$N,N'$-tetraacetic acid, 0.5 mM) and with the detergent Brij-58 (polyoxethylene-20-cetyl ether, 0.5%), which has been shown to eliminate the sarcoplasmic reticulum and the sarcolemma (29); these cells were directly activated by calcium ions released iontophoretically in the following solution (mM): NaCl 132, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4, $Na_2ATP$ 5, imidazol 18, EGTA $125 \times 10^{-3}$, glucose 7; *2)* cells ($n$ = 19) contracting spontaneously in a solution with the same components as mentioned above except that there was no EGTA and no Brij-58 added; the average contaminating calcium ($2.5 \times 10^{-6}$ M determined by atomic absorption spectrophotometry, Perkin-Elmer 603) was sufficient to initiate spontaneous contractions triggered by the sarcoplasmic reticulum (10). Reproducible results could be obtained in these spontaneously beating cells after careful dissection, selecting only contractions with as little variation as possible, both in peak tension and in time to peak tension. One end of each cell was fixed to a glass microtool, while the other end was attached to a transducer (9). In both groups of cells the mechanical properties of relaxation were analyzed from force traces of isotonic contractions at increasing afterloads or after abrupt alterations in load.

### *Mammalian Papillary Muscles and Frog Ventricular Strips*

We quickly removed right ventricular papillary muscles from cats ($n$ = 8), after anesthetization with sodium pentobarbital (40 mg/kg ip), and left ventricular papillary muscles from adult rats ($n$ = 6), after decapitation. Longitudinal muscle strips (about 5 mm long and 0.5–1 mm thick) were cut from frog heart ventricle (*Rana esculenta*, $n$ = 30). Suitable preparations were selected according to previously published criteria (4, 5, 17). The preparations were stimulated with rectangular pulses of 5 ms duration and with a stimulus intensity slightly above threshold, applied by two platinum electrodes arranged longitudinally on each side of the muscle. Stimulation rate was 12 beats/min for cats and frogs and 6 beats/min (18) for rats. The bathing solution in which the preparations were vertically suspended, contained (mM): NaCl 118, KCl 4.7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, $KH_2PO_4$ 1.1, $NaHCO_3$ 24, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.5, and glucose 4.5. This solution was bubbled with a mixture of 95% $O_2$ and 5% $CO_2$ adjusted to a pH of 7.4 and maintained at 29°C. After a stabilization period, the experiments were carried out at $l_{max}$, i.e., the initial length at the peak of the length-active tension curve. The electromagnetic lever, the force trans-

0363-6135/79/0000-0000$01.25 Copyright © 1979 the American Physiological Society

ducer, and the controlling devices were described previously (4).

Inhibition of calcium uptake (3, 14, 31, 36) in mammalian papillary muscle was caused by adding caffeine (1–10 mM). Tetanus in cat papillary muscles (19) was produced by imposing trains of maximal intensity stimuli while bathing the muscles in 10 mM caffeine and 10 mM calcium. The mechanical performance of frog ventricular strips was analyzed at various extracellular calcium concentrations (mM): 1.25, 2.5, 3, 3.5, ···, 7 and 7.5; seven strips were studied in a solution with 84 mM sodium and 100 mM sucrose, with the remaining components unchanged. The influence of ouabain ($10^{-6}$ or $2 \times 10^{-6}$ M) was studied in another five strips. The effects of high calcium, low sodium, and ouabain on the mechanical performance of relaxation were entirely reversible on returning to the normal solution.

The results were identical in all muscles studied. Only representative examples were illustrated in the figures. Mean values for the results obtained in frog ventricular strips were grouped in Fig. 5.

## RESULTS

### *Single Mammalian Rat Cells*

In Fig. 1*A*, an isotonic afterloaded contraction (*contraction a*) from a single cardiac rat cell pretreated with Brij-58 was superimposed on an isometric contraction (*contraction d*). Both contractions were initiated by the same amount of iontophoretically released calcium. No differences were observed in the time course of isometric relaxation of these two contractions. Moreover, two sudden changes in load (load clamps) in the middle of the force plateau (*contractions b* and *c*) could not induce any difference in the time course of the isometric relaxation as all contractions coincided at their ends.

In Fig. 1*B*, an afterloaded contraction from a spontaneously beating cell was superimposed on a spontaneous isometric contraction. By contrast to Brij-pretreated preparations, the afterloaded force trace was always enclosed by the isometric force trace. However, as these spontaneous contractions were much smaller and faster than those induced by iontophoresis, no further mechanical analysis of the time course or load clamps could be performed, due to technical limitations. Yet, in an attempt to quantify the effect of loading or the degree of load dependence on relaxation, we compared the area under the force vs. time curve in the afterloaded contraction to the area under the force vs. time curve in the isometric contraction below the same level of load as reached in the afterloaded contraction. The ratio of these areas averaged 0.84 ± 0.02 (SE) ($n$ = 90 contractions obtained from a total of 19 cells); both series of areas were significantly different ($P < 0.001$).

### *Mammalian Papillary Muscles*

Load dependence was observed in rat papillary muscle in a control series of superimposed afterloaded contractions (Fig. 2*A*) and in records of afterloaded contractions during which abrupt load alterations were imposed (load clamps) (Fig. 2*B*). Caffeine (3 mM) converted this load-dependent relaxation into a load-insensitive relaxation (Fig. 2, *C* and *D*) as no differences can be seen in the time course of load-bearing isotonic contractions as opposed to isometric contractions. In all preparations load-sensitivity was restored by washing with normal Krebs-Ringer solution.

In contrast to the response in rat myocardial tissue, the addition of caffeine (3, 5, or even 10 mM) to cat papillary muscles failed to eliminate the load sensitivity of relaxation. However, cat papillary muscles became insensitive to load when tetanized by imposing trains of high-intensity stimuli in 10 mM caffeine and 10 mM calcium (Fig. 3) as load was borne during an isotonic contraction for the same time duration as during an isometric contraction.

### *Frog Ventricular Strips*

*Effects of high calcium.* In Fig. 4, *A* and *B* the overall time course of relaxation of frog cardiac muscle was hardly affected either by the level of the afterload or by abrupt alterations in load, as the isometric phases coincided over their largest portion at all loads. By contrast, when the calcium concentration of the bathing solution was increased from 2.5 to 7.5 mM (Fig. 4, *C* and *D*), the

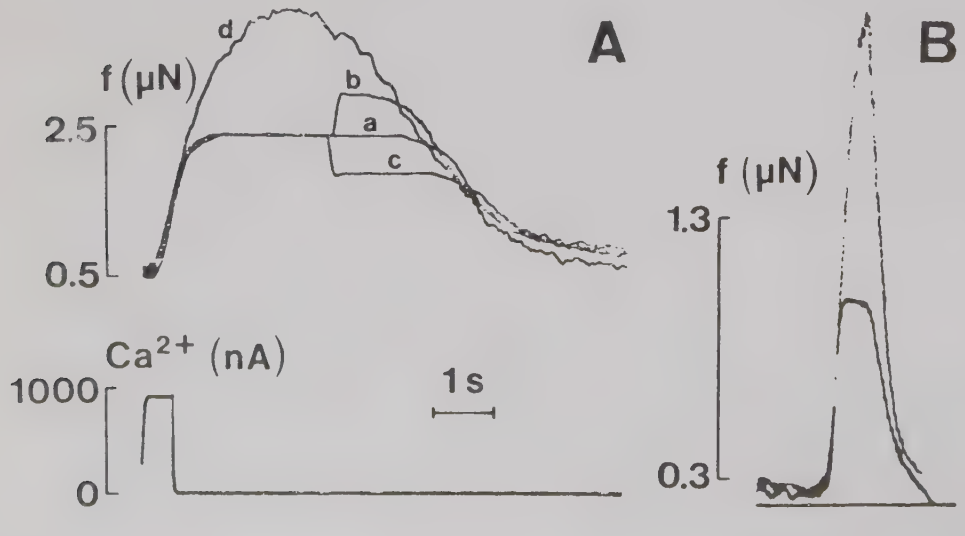



FIG. 1. *A*: superimposed afterloaded contractions, initiated by iontophoresis in an isolated cardiac cell (90 x 15 μm) treated with Brij-58; f, force; $Ca^{2+}$, iontophoretic calcium pulse; the number of calcium ions was expressed as the product of the current through the micropipette and the duration of the pulse. An isometric contraction (*d*) was superimposed on three afterloaded contractions. During the force plateau of two of these afterloaded contractions (*b*, *c*) load was suddenly altered (load clamp). *B*: afterloaded contraction superimposed on an isometric contraction in a spontaneously contracting cell (50 x 15 μm). The isotonic length changes of the contractions were not displayed on the figure since their amplitude was at the detection limit of the lever recording system.

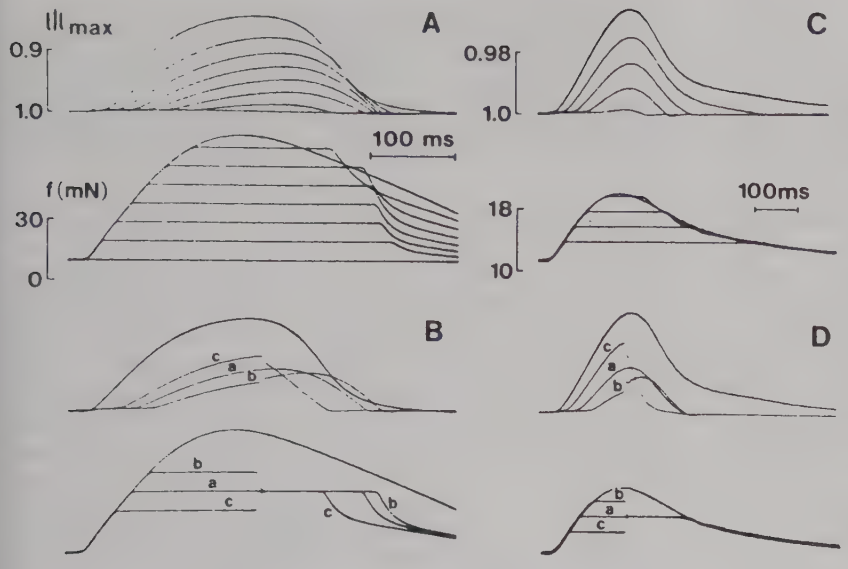



FIG. 2. Effect of 3 mM caffeine on rat papillary muscle. *A* and *B*: control experiments; length (*upper*) and force (*lower*) traces at $l_{max}$ were plotted as a function of time. *C* and *D*: after addition of caffeine. *A* and *C*: a series of superimposed afterloaded isotonic contractions against various loads, i.e., from an isotonic twitch at preload only, then with different afterloads up to a full isometric twitch. After addition of caffeine (*C*), no time differences can be seen between the time course of relaxation traces in the different afterloaded contractions as opposed to the control experiment (*A*). *B* and *D*: traces of a loading (*contraction c*) and an unloading step (*contraction b*) of the same magnitude and imposed at the same time during the contraction are shown. *Contraction a* is the control afterloaded isotonic contraction to which the muscle was clamped. Although the load clamp induced a strikingly different time course in the control contractions the relaxation traces of three twitches (*a, b, c*) coincided after addition of caffeine. *Panels A* and *B* have the same calibrations, *panels C* and *D* also. Characteristics of the muscle at $l_{max}$: length 6.0 mm; cross-sectional area 1.19 mm$^2$. Temperature 29°C.

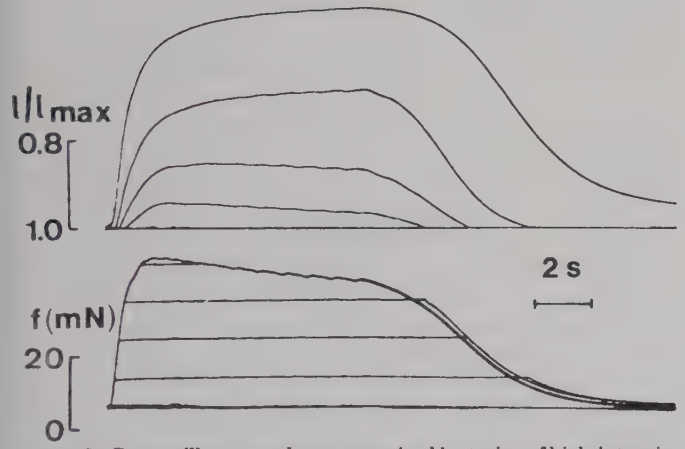



FIG. 3. Cat papillary muscle was tetanized by trains of high-intensity electrical stimuli (10/s, 2–3 s duration) after 10 mM caffeine and 10 mM calcium. With different loads up to an isometric state, relaxation coi cided with the isometric relaxation.

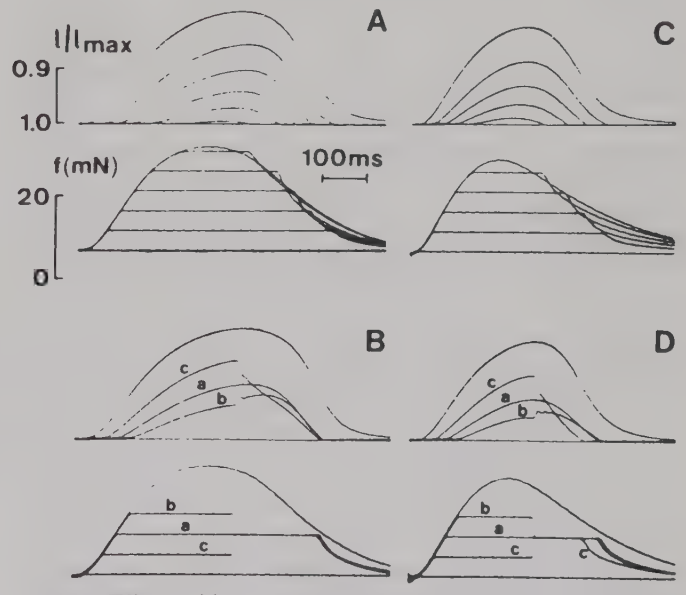



FIG. 4. Effects of low (2.5 mM) (*panels A and B*) and high (7.5 mM) (*panels C and D*), external calcium concentration on isolated frog ventricular cardiac muscle; length (*upper*) and force (*lower*) traces at $l_{max}$ were plotted as a function of time. *Panels A* and *C*: a series of superimposed afterloaded isotonic contractions against various loads, i.e., from an isotonic twitch at preload only, then with different afterloads up to a full isometric twitch. At 2.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ (*panel A*) traces of the isometric relaxation phase at different loads are not well separated in time, while at 7.5 mM (*panel C*) they clearly are, so that the isotonic contractions were always over before the isometric control beat. In *panels B* and *D*, traces of a loading (*contraction c*) and an unloading step (*contraction b*) of the same magnitude and imposed at the same time during the contraction are shown. *Contraction a* is the control afterloaded isotonic contraction to which the muscle was clamped. Although the load after the clamp step was the same in contractions *a*, *b*, and *c* the subsequent time courses of contraction and relaxation were strikingly different at 7.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ (*panel D*), in contrast to the findings at 2.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ (*panel B*). Same calibrations in all panels. Characteristics of the muscle at $l_{max}$: length 5 mm, cross-sectional area 1.02 mm$^2$. Temperature 29°C.

relaxation in frog ventricular cardiac muscle was moderately influenced by the load, and in this respect resembled to some extent mammalian cardiac muscle where relaxation was shown to be markedly sensitive to the loading conditions at any calcium concentration (7). When the external calcium concentration was increased stepwise from 2.5 to 3.0, ··· 7.0, and 7.5 mM (Figs. 5 and 6), a small increase in the rate of shortening and of force development without any significant change in amplitude was noted, reaching a maximum value around 5 mM. Most striking was the abbreviation of the overall duration of the contraction when calcium concentration was increased. At high calcium concentrations of 4.5 mM, the amplitude of the contractions diminished because the abbreviation of the twitch had become a limiting factor. This decrease in amplitude was significant beyond a $[Ca^{2+}]_o$ of 5.5 mM. Load sensitivity of relaxation in frog cardiac muscle became also progressively more evident beyond this calcium concentration.

*Effects of low sodium.* When the external sodium concentration was reduced from 142 (Fig. 7, *A* and *B*) to 84 mM (Fig. 7, *C* and *D*) and substituted by sucrose (100 mM), the overall duration of the contractions again markedly shortened ($P < 0.001$). Along with this abbreviation, the time course of relaxation became progres-

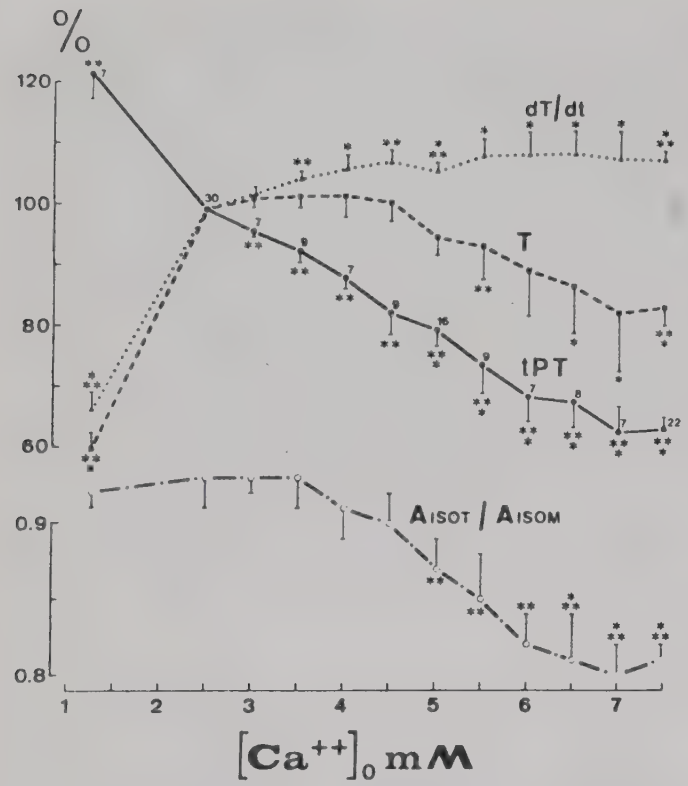



FIG. 5. *Upper panel*: isometric tension (T), time to peak tension (*t*PT), peak rate of force development (dT/d*t*), expressed as the percentage of the value obtained at 2.5 mM $[Ca^{2+}]_o$, were plotted as a function of $[Ca^{2+}]_o$. Note a slight increase in dT/d*t* from 2.5 to 7.5 mM, a decline of T starting at 4.5 mM, while *t*PT diminished markedly over the whole range of $[Ca^{2+}]_o$ from 1.25 to 7.5 mM. *Lower panel*: Aisot, isotonic force area limited by the afterloaded force trace at about 50% of the isometric tension. Aisom, force area limited by the isometric force trace below a force value corresponding to the afterload in the isotonic contraction. Aisot/Aisom has been taken arbitrarily as the expression of load dependence; a decreasing ratio indicating an increasing manifestation of load dependence. The ratio clearly declines above 3.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ unrelated to a decreased isometric tension. Each value of T, dT/d*t*, *t*PT, Aisot/Aisom for each muscle was compared over the whole range of calcium concentrations with its control value at 2.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ in the same muscle, by means of a paired *t* test. The numbers of compared observations are indicated on the *t*PT curve; e.g., the 7 values at 1.25 mM $Ca^{2+}$ were compared with the 7 corresponding control values out of 30 observations at 2.5 mM $[Ca^{2+}]_o$. Symbols of significance of the paired test were added only when the results were statistically different from the values obtained at 2.5 mM $[Ca^{2+}]_o$. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

sively more sensitive to the loading conditions as evident from both afterloaded and load-clamped contractions. These effects were less marked when the sodium concentration was decreased to 107 mM. At a sodium concentration of 63 mM, load dependence was always present. Similarly as at the highest calcium concentrations, the excessive abbreviation of the contractions markedly reduced the amplitude of contraction.

*Effects of ouabain.* After addition of ouabain ($1 \times 10^{-6}$ to $2 \times 10^{-6}$ M) the time course of relaxation once more became sensitive to loading conditions. These results were similar to the observations at high calcium or low sodium concentration.

*Effects of temperature.* In the three conditions, i.e., high calcium, low sodium, and ouabain, where relaxation of frog cardiac muscle had become moderately responsive to the loading conditions, relaxation could again be made load independent by lowering the temperature from 29°C to 22°C. Furthermore, load dependence was revealed at 2.5 mM $Ca^{2+}$ by increasing the temperature from 29°C to 34°C.

## DISCUSSION

Load dependence was thought to reflect the presence of an effective calcium sequestering system (6, 7). Indeed, after destruction of the membranous system with detergent (29), relaxation of isolated single mammalian cardiac cells became independent of the load (Fig. 1*A*). However, spontaneous contractions in single cardiac cells are known to be initiated by a functional sarcoplasmic retic-

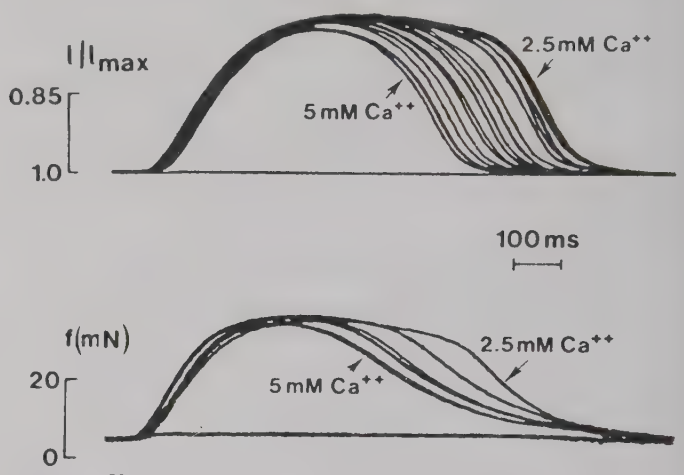



FIG. 6. Shortening traces of preloaded contractions (*upper*) and force traces of isometric contractions (*lower*) when $[Ca^{2+}]_o$ was increased from 2.5 mM to 5 mM. Isotonic and isometric traces were alternated and recorded at random with respect to time. Arrows indicate steady-state contractions obtained at both concentrations.

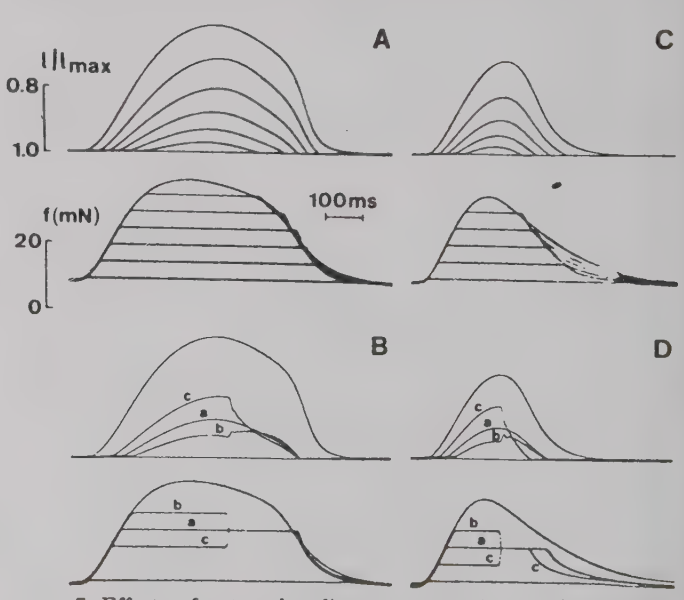



FIG. 7. Effects of external sodium concentration $[Na^+]_o$ 142 mM (*panels A* and *B*) and 84 mM (panels *C* and *D*) on length (*upper*) and force (*lower*) traces as a function of time in frog cardiac muscle. Same format as in Fig. 4; characteristics of the muscle at $l_{max}$: length 6.75 mm, cross-sectional area 0.82 $mm^2$. Temperature 29°C.

ulum (10, 11). The appearance of a load-dependent relaxation in these spontaneously beating cells would again emphasize the primary role of a functional calcium sequestering system, presumably the sarcoplasmic reticulum for load dependence to become manifest. An additional argument for the requirement of an efficient calcium uptake system is the absence of a load-sensitive relaxation after addition of caffeine in rat papillary muscle. Caffeine is known to inhibit calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum (3, 14, 31, 36), to increase the influx of calcium through the sarcolemma (3, 16, 20, 21, 26, 35), and thus to cause a prolonged increase of intracellular calcium. On the other hand, in cat papillary muscle load insensitivity only appeared during tetanic stimulation in caffeine, when the calcium uptake system was overwhelmed by the activating calcium. Cat seems to dispose of a more effective calcium sequestering system as a substantial insult (tetany) is required before load dependence disappears. Thus both experimental interventions caused a prolonged increase of intracellular calcium near the force-generating sites in these mammalian papillary muscles and allowed for reformation of broken crossbridges, prolongation of relaxation, and hence load-independent relaxation.

Yet, relaxation of intact frog cardiac muscle, which was previously shown to be insensitive to load (7), now appeared moderately load dependent under a variety of conditions such as high calcium, low sodium, and ouabain. Could this mean that the sarcoplasmic reticulum in frog cardiac muscle would be more important than previously presumed and that it could be made effective under these specific conditions? However, anatomic paucity of the sarcoplasmic reticulum in frog ventricular cardiac muscle has been emphasized (32). In support of these structural findings, physiological observations have indicated a negligible contribution of the intracellular calcium stores to the activation process in frog cardiac muscle; instead, a transsarcolemmal calcium influx appeared to be the main activating source (1, 21). On the other hand, several investigators have shown that part of the mechanical response was induced by the release of activating calcium from intracellular stores (22, 34). Other results suggested that the sarcoplasmic reticulum appeared better developed in frog cardiac muscle than previously described (30, 37) and was also to play an important role in contraction and relaxation (8, 38). The present observation of a load-dependent relaxation in frog cardiac muscle under the particular experimental conditions might thus suggest an effective sarcoplasmic reticulum. Yet, although the sarcoplasmic reticulum in frog heart might be functional under normal conditions, it might appear less effective being normally masked by an overwhelming transmembranous activation (2, 22–25, 33, 34). How could high calcium, low sodium, or ouabain unmask this functional sarcoplasmic reticulum? Could these three experimental conditions interfere with the transmembranous activation? Previous observations have shown that high calcium (27), low sodium (28), and ouabain (15) reversibly abbreviated the duration of the action potential. Hence, the shortened contraction might then probably result from the declining preponderance of transmembranous activation. In the presence of a diminished amount of activating calcium a functional sarcoplasmic reticulum would be able to handle myoplasmic calcium more easily, thus revealing in frog ventricular muscle a load-dependent relaxation similar to the one observed in mammalian cardiac muscle.

Present addresses: Y. C. Lecarpentier, INSERM U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes, France; L. H. S. Chuck, Cardiovascular Division, Room 1186 Moffitt, Univ. of California, San Francisco, CA 94143.

Received 2 October 1978; accepted in final form 23 May 1979.

REFERENCES

1. Anderson, T. W., C. Hirsch, and F. Kavaler. Mechanism of activation of contraction in frog ventricular muscle. *Circ. Res.* 41: 472–480, 1977.
2. Benninger, C., H. M. Einwachter, H. G. Haas, and R. Kern. Calcium-sodium antagonism on the frog's heart: a voltage clamp study. *J. Physiol. London* 259: 617–645, 1976.
3. Blinks, J. R., C. B. Olson, B. R. Jewell, and P. Braveny. Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart muscle. *Circ. Res.* 30: 367–392, 1972.
4. Brutsaert, D. L., and V. A. Claes. Onset of mechanical activation of mammalian heart muscle in calcium- and strontium-containing solutions. *Circ. Res.* 35: 345–357, 1974.
5. Brutsaert, D. L., and P. R. Housmans. Load clamp analysis of maximal force potential of mammalian cardiac muscle. *J. Physiol. London* 271: 587–603, 1977.
6. Brutsaert, D. L., V. A. Claes, and N. M. De Clerck. Relaxation of mammalian single cardiac cells after pre-treatment with the detergent Brij-58. *J. Physiol. London* 283: 481–491, 1978.
7. Brutsaert, D. L., N. M. De Clerck, M. A. Goethals, and P. R. Housmans. Relaxation of ventricular cardiac muscle. *J. Physiol. London* 283: 469–480, 1978.
8. Chapman, R. A., and D. J. Miller. The effects of caffeine on the contraction of the frog heart. *J. Physiol. London* 242: 589–613, 1974.
9. De Clerck, N. M., V. A. Claes, and D. L. Brutsaert. Force velocity relations of single cardiac muscle cells. Calcium dependency. *J. Gen. Physiol.* 69: 221–241, 1977.
10. Fabiato, A., and F. Fabiato. Excitation-contraction-coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium-dependent cyclic and tonic contraction. *Circ. Res.* 31: 293–307, 1972.
11. Fabiato, A., and F. Fabiato. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* 40: 119–129, 1977.
12. Fawcett, D. W., and N. S. McNutt. The ultrastructure of the cat myocardium. *J. Cell Biol.* 42: 1–45, 1969.
13. Forssmann, W. G., and L. Girardier. A study of the T-system in rat heart. *J. Cell Biol.* 44: 1–14, 1970.
14. Fuchs, F. Inhibition of sarcotubular calcium transport by caffeine: species and temperature dependence. *Biochim. Biophys. Acta* 172: 566–570, 1969.
15. Greenspan, A. M., and M. Morad. Electromechanical studies on the inotropic effects of acetylstrophanthidin in ventricular muscle. *J. Physiol. London* 253: 357–384, 1975.
16. Guthrie, J. R., and W. G. Nayler. Interaction between caffeine and adenosine on calcium exchangeability in mammalian atria. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 170: 249–255, 1967.
17. Henderson, A. H., and D. L. Brutsaert. Force-velocity-length relationship in heart muscle: lack of time-independence during twitch contractions of frog ventricle strips with caffeine. *Pfluegers Arch.* 348: 59–64, 1974.
18. Henderson, A. H., D. L. Brutsaert, R. Forman, and E. H. Sonnenblick. Influence of caffeine on force development and force-frequency relations in cat and rat heart muscle. *Cardiovasc. Res.* 8: 162–172, 1974.
19. Henderson, A. H., R. Forman, D. L. Brutsaert, and E. H.

SONNENBLICK. Tetanic contraction in mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.*, Suppl. 1: 96–100, 1971.

20. ISAACSON, A., AND A. SANDOW. Quinine and caffeine effects on 45 Ca movements in frog sartorius muscle. *J. Gen. Physiol.* 50: 2109–2128, 1967.
21. KAVALER, F., T. W. ANDERSON, AND V. J. FISHER. Sarcolemmal site of caffeine's inotropic action on ventricular muscle of the frog. *Circ. Res.* 42: 285–290, 1978.
22. LEOTY, C., AND G. RAYMOND. Mechanical activity and ionic currents in frog atrial trabeculae. *Pfluegers Arch.* 334: 114–128, 1972.
23. LÜTTGAU, H. C., AND R. NIEDERGERKE. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J. Physiol. London* 143: 486–505, 1958.
24. MORAD, M., AND Y. GOLDMAN. Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development of tension. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 27: 259–313, 1974.
25. MORAD, M., AND R. K. ORKAND. Excitation-contraction coupling in frog ventricle: evidence from voltage clamp studies. *J. Physiol. London* 219: 167–189, 1971.
26. NAYLER, W. G. Effect of caffeine on cardiac contractile activity and radio-calcium movement. *Am. J. Physiol.* 204: 969–974, 1963.
27. NIEDERGERKE, R., AND R. K. ORKAND. The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart. *J. Physiol. London* 184: 291–311, 1966.
28. NIEDERGERKE, R., AND R. K. ORKAND. The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration. *J. Physiol. London* 184: 312–334, 1966.
29. ORENTLICHER, M., J. P. REUBEN, H. GRUNDFEST, AND P. W. BRANDT. Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* 63: 168–186, 1974.
30. PAGE, S. G., AND R. NIEDERGERKE. Structures of physiological interest in the frog heart ventricle. *J. Cell Sci.* 11: 179–203, 1972.
31. SHINE, K. I., AND G. A. LANGER. Caffeine effects upon contraction and calcium exchange in rabbit myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 3: 255–270, 1971.
32. STALEY, N. A., AND E. S. BENSON. The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.* 38: 99–113, 1968.
33. VASSORT, G. Influence of sodium ions on the regulation of frog myocardial contractility. *Pfluegers Arch.* 339: 225–240, 1973.
34. VASSORT, G., AND O. ROUGIER. Membrane potential and slow inward current dependence of frog cardiac mechanical activity. *Pfluegers Arch.* 331: 191–203, 1972.
35. VERDONCK, F., P. BUSSELEN, AND E. CARMELIET. Ca-action potentials and contractions of heart muscle in Na-free solutions. Influence of caffeine. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 80: 167–169, 1972.
36. WEBER, A., AND R. HERZ. Relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol.* 52: 750–759, 1968.
37. WINEGRAD, S. Studies of cardiac muscle with a high permeability to calcium produced by treatment with ethylenediaminetetraacetic acid. *J. Gen. Physiol.* 58: 71–93, 1971.
38. WINEGRAD, S. Spontaneous mechanical activity in depolarized frog ventricle. *J. Gen. Physiol.* 68: 145–157, 1976.

# Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure

Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN, P. GASTINEAU, AND P. Y. HATT
*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes; and Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Nationale Supérieure de Techniques Avancées, Ecole Polytechnique, 91120 Palaiseau, France*

LECARPENTIER, Y., J. L. MARTIN, P. GASTINEAU, AND P. Y. HATT. *Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure.* Am. J. Physiol. 242 (Heart Circ. Physiol. 11): H855–H861, 1982.—Mechanical properties of relaxation were studied in left ventricular rat papillary muscle during cardiac hypertrophy induced by chronic pressure and/or volume overload. Maximum velocity of isotonic lengthening was linearly related to total extent of isotonic shortening and to maximum velocity of isotonic contraction and depended on the type of chronic overloading without correlation with the degree of cardiac hypertrophy. Time to peak shortening was significantly increased in each group of hypertrophied heart muscles as compared to controls. The sensitivity of cardiac relaxation to the loading conditions was determined by the time course of relaxation. To quantify the degree of load sensitivity, we measured the ratio of isotonic area to isometric area, which was the area limited by the afterloaded force vs. time at 50% of the isometric peak tension divided by the area of the force vs. time trace in the isometric twitch below the same level of load. The value of this ratio was about 0.81 in normal rat and did not show any significant differences in hypertrophied heart muscles even at the terminal stage of congestive heart failure. During acute hypoxia the load sensitivity of relaxation disappeared both in normal and in hypertrophied hearts. Thus inadequacy in oxygen supply has more drastic effects, as compared with those induced by chronic overload, probably by affecting the sarcoplasmic reticulum uptake of activating calcium.

sarcoplasmic reticulum calcium; chronic overloading

ALTHOUGH RELAXATION of the normal heart is now better understood (6), the mechanical processes underlying relaxation during cardiac hypertrophy are still not perfectly documented. Recently relaxation in the normal mammalian heart has been shown to be sensitive to loading conditions in intact papillary muscle (5) as well as in spontaneously beating single cells (22). The results led to the concept of load dependence of relaxation. This mechanical property disappears in cardiac papillary muscles obtained from cats and rats after caffeine (22) and in single mammalian cardiac cells in which the sarcoplasmic reticulum has been biochemically destroyed (4). It has been assumed that load dependence of mammalian heart relaxation involves an effective calcium-accumulating system, presumably the sarcoplasmic reticulum.

On the other hand, the development of cardiac hypertrophy and congestive heart failure induced by chronic overloading has often been found to be associated with alterations of membrane systems such as sarcolemma, mitochondria, and sarcoplasmic reticulum. In particular several abnormalities in microsomal calcium-transport activities have been identified (9, 14, 17, 24, 28). In the following experiments the mechanical properties of cardiac relaxation have been studied during different types and stages of ventricular hypertrophy in rat after exposure to chronic pressure and/or volume overload. Cardiac relaxation has always been found to remain load sensitive, even at the latest phases of congestive heart failure. However, acute hypoxia induced reversible disappearance of load dependence of relaxation both in normal and hypertrophied heart muscle.

The present study emphasizes the existence of intracellular calcium-sequestering systems efficient enough to preserve the homeostasis of load sensitivity of relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure.

## METHODS

*Preparation of animals.* This work was carried out on left ventricular papillary muscles from adult Wistar rats whose hearts were subjected to different types of pressure and volume overload resulting in various degrees of cardiac hypertrophy. Wistar rats were subdivided into five groups. *Group 1*: control rats. *Group 2*: aortic insufficiency (AI). AI was created by perforation of the semilunar cusp of the aortic valve with a small catheter introduced into the right carotid artery. The duration (d) of chronic cardiac overloading in months was as follows: d = 3.8 ± 0.5 mo (mean ± SE). *Group 3*: aortocaval fistula (ACF). A subdiaphragmatic aortocaval communication was induced between abdominal aorta (between the left renal artery and aortic bifurcation) and inferior vena cava. The patency of the fistula was verified according to criteria previously described (16). d = 14.5 ± 1.7 mo. *Group 4*: aortic stenosis (AS). AS was obtained with subtotal subdiaphragmatic-suprarenal constriction of the abdominal aorta (1, 19). d = 11.1 ± 1.6 mo. *Group 5*: AS + AI. Double pressure and volume overload was successively induced in the same rat after a 15-day interval between the two operations. d = 11.8 ± 2.3 mo.

Some of the rats even suffered from congestive heart failure with dyspnea, pulmonary and hepatic congestion, and subcutaneous edema. This was observed in several rats of *groups 2* and *3* and in all animals of *group 5*. For

0363-6135/82/0000-0000$01.25 Copyright © 1982 the American Physiological Society

each group the number of animals, parameters of cardiac hypertrophy and myocardial performance, and statistical values are indicated in Table 1.

*Left ventricular papillary muscles.* Left ventricular papillary muscles were quickly removed from rats after decapitation. The preparations were electrically stimulated by two parallel platinum electrodes delivering 5-ms square pulses at voltage slightly above threshold. Stimulation frequency was 6 beats/min. The bathing solution was bubbled with a gas mixture of 95% $O_2$-5% $CO_2$ (maintained at pH 7.4, 29°C) and contained (in mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; $MgSO_4 7H_2O$, 1.2; $KH_2PO_4$, 1.1; $NaHCO_3$, 24; $CaCl_2 6H_2O$, 2.5; and glucose 4.5. After a 1-h stabilization period the experiments were carried out at $L_{max}$, i.e., the initial length at the apex of the length-active tension curve. Hypoxia was induced both in normal and in hypertrophied papillary muscles, bubbling the solution with 95% $N_2$-5% $CO_2$ during 20 min. Depressant effects of hypoxia were entirely reversible after bubbling the solution again with 95% $O_2$-5% $CO_2$.

*Frog ventricular strips.* Longitudinal muscle strips (about 5 mm long and 0.5–1 mm thick) were cut from frog heart ventricles (*Rana esculenta*, $n = 10$) and studied in the same bathing solution and with the same apparatus used for rat papillary muscles.

The electromagnetic lever system, the force transducer, and the control units were similar to those previously described (3). Briefly, the servo-controlled current through the coil of the electromagnet determined the load of the papillary muscle. The equivalent moving mass of the whole system was 155 mg, and the compliance was 0.2 μm/mN. The displacement of the lever was measured with a photoelectric transducer consisting of an incandescent lamp, a miniature photodiode, and a preamplifier. Muscle shortening induced a displacement of the lever, which modulated the light emitted by the lamp. Subsequent current alterations in the photodiode were converted into voltage alterations. The system had a linear range up to 2.5 mm of muscle shortening. Force, shortening length, and shortening velocity of each muscle were displayed on a storage display unit (Tektronix 611) and photographed with a hard-copy unit (Tektronix 4601).

*Statistical analysis.* The data were expressed as means ± SE. The means ± SE of the responses in control and hypertrophied heart muscles were compared for statistical significance by means of the one-way analysis of variance. When the value of $F$ indicated subgroup differences with a probability of $P > 0.95$, variance analysis was followed by Student's unpaired $t$ test (Table 1). Differences were regarded as significant when their probability of occurring by chance was less than 5%. When the significance level of $F$ was more than 0.05, the unpaired $t$ test was not performed. Linear regression was performed by least squares.

## RESULTS

*Heart weight and cardiac hypertrophy.* The degree of cardiac hypertrophy was expressed in terms of heart weight and heart weight-body weight ratio. In all overloaded cardiac muscles mean values of heart weight and heart weight-body weight ratio were significantly increased as compared to controls (Table 1). Particularly in *groups 2, 3,* and *5* heart weight sometimes reached two or three times that of normal rats, which is comparable to the degree of human cardiac hypertrophy. During aortic constriction heart weight and the heart weight-body weight ratio slightly increased, as might be expected in view of the 11-mo overload (Table 1). Most of the cardiac growth generally occurred during the first 2 mo after the operation and remained relatively constant throughout the remainder of cardiac overloading. During this period the degree of cardiac hypertrophy appeared to depend more on the type of overload than on its duration.

*Time to peak shortening.* The time to reach peak of shortening of the isotonic preloaded twitch (TPS) appeared to be slightly prolonged during cardiac hypertrophy. Covariance analysis proved significant differences between mean value of control TPS and that of TPS of the overall group of hypertrophied hearts (Table 1). In

TABLE 1. *Values of mechanical parameters*

| | Group 1: Controls ($n = 16$) | Group 2: AI ($n = 10$) | Group 3: ACF ($n = 12$) | Group 4: AS ($n = 9$) | Group 5: AS + AI ($n = 4$) | $F$ Test |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Heart weight, g | 0.85 ± 0.03 | 1.91 ± 0.10‡ | 1.68 ± 0.08‡ | 1.25 ± 0.08‡ | 2.26 ± 0.15‡ | $F(4, 52) = 40.1$ $< 0.001$ |
| Heart weight/body weight ($10^{-3}$) | 2.75 ± 0.14 | 4.14 ± 0.15‡ | 5.20 ± 0.17‡ | 3.51 ± 0.30* | 4.63 ± 0.31‡ | $F(4, 45) = 25.8$ $< 0.001$ |
| TPS, ms | 167 ± 4 | 186 ± 4† | 180 ± 3* | 182 ± 5* | 187 ± 4* | $F(4, 49) = 4.33$ $< 0.01$ |
| $-dL/dt_{max}$, $-L_{max}$/s | 2.16 ± 0.10 | 2.20 ± 0.16 (NS) | 1.50 ± 0.10‡ | 1.37 ± 0.13‡ | 0.93 ± 0.04‡ | $F(4, 41) = 14.6$ $< 0.001$ |
| $(+dL \cdot dt_{max}^{-1})/(-dL \cdot dt_{max}^{-1})$ | 0.80 ± 0.02 | 0.78 ± 0.03 | 0.86 ± 0.04 | 0.83 ± 0.05 | 0.81 ± 0.09 | $F(4, 41) = 1.05$ $> 0.05$ |
| $-dT \cdot dt_{max}^{-1} \cdot mm^{-2}$, $g \cdot s^{-1} \cdot mm^{-2}$ | 24.2 ± 1.4 | 14.8 ± 1.9† | 12.8 ± 1.3‡ | 13.8 ± 0.9‡ | 9.3 ± 0.3‡ | $F(4, 43) = 14.5$ $< 0.001$ |
| isot A/isom A | 0.81 ± 0.01 | 0.78 ± 0.01 | 0.80 ± 0.01 | 0.80 ± 0.01 | 0.83 ± 0.01 | $F(4, 49) = 2.08$ $> 0.05$ |

Values are means ± SE; $n$, number of animals. $-dL/dt_{max}$, maximum isotonic lengthening velocity; $+dL/dt_{max}$, maximum isotonic shortening velocity; $-dT \cdot dt_{max}^{-1} \cdot mm^{-2}$, peak of isometric tension per cross-sectional area; isot A/isom A, load dependence ratio (see text); AI, aortic insufficiency; ACF, aortocaval fistula; AS, aortic stenosis. Below $F$ values are indicated the significance level of $F$. Statistical significance of Student's $t$ test for each mean of hypertrophied heart groups vs. mean of control group: * $P < 0.05$; † $P < 0.01$; ‡ $P < 0.001$; NS, nonsignificant

contrast, no statistically significant difference was observed between mean values of the four hypertrophied groups. Thus increased TPS, always observed in each group of hypertrophied heart muscle, depended neither on the type nor on the stage of chronic overloading.

*Negative peak isometric tension per cross-sectional area:* $-dT \cdot dt_{max}^{-1} \cdot mm^{-2}$ *(*$g \cdot s^{-1} \cdot mm^{-2}$*).* Mean values of normalized peak isometric relaxation were found to be significantly decreased in the four hypertrophied heart groups as compared with that of control rats (Table 1). The increase in cross-sectional area contributed widely to lower $-dT \cdot dt_{max}^{-1} \cdot mm^{-2}$ during the process of cardiac hypertrophy.

*Maximum velocity of relaxation.* Maximum lengthening velocity of the twitch preloaded at $L_{max}$ ($-dL/dt_{max}$) was found to be affected by the type of chronic overloading (Table 1). In *group 2* (IA), in which the degree of cardiac hypertrophy was marked, $-dL/dt_{max}$ did not change significantly as compared with controls. However, $-dL/dt_{max}$ markedly decreased in the *groups 4* (AS) and *5* (AI + AS), although the degree of cardiac hypertrophy was slightly increased in the former group and highly increased in the latter one. Table 1 shows that extent of cardiac hypertrophy was significantly higher in *group 3* (ACF) than in *group 4* (AS), whereas in these two groups $-dL/dt$ respectively decreased from 1.50 ± 0.10 to 1.37 ± 0.13 $L_{max}$/s. So, the decrease in maximum lengthening velocity does not seem to be correlated with the degree of cardiac growth ($r = 0.2$) but rather to depend on the type of chronic overloading.

Furthermore, in preloaded twitch, maximum lengthening velocity appeared to be related to maximum isotonic shortening velocity ($+dL/dt_{max}$) and to maximum shortening extent at the end of contraction phase at TPS.

Covariance analysis showed that the ratio of $+dL/dt_{max}$ to $-dL/dt_{max}$ did not differ significantly in the five groups (Table 1). Moreover, in Fig. 1 $-dL/dt_{max}$ was linearly related to total extent of isotonic shortening at TPS ($r = 0.89$). Total extent of isotonic shortening, $-dL/dt_{max}$, and $+dL/dt_{max}$ were similarly depressed in *groups 3-5.* In contrast, in *group 2* (AI) these values did not differ significantly from those of controls in spite of consistent changes in the degree of cardiac hypertrophy, $-dT \cdot dt_{max}^{-1} \cdot mm^{-2}$, and TPS (Table 1). Thus the mechanical changes (TPS, $-dL/dt_{max}$, $+dL/dt_{max}$, total extent of shortening, $-dT \cdot dt_{max}^{-1} \cdot mm^{-2}$) greatly depended on the type of overloading without modifications parallel with extent of cardiac growth.

*Load dependence of relaxation.* The concept of load sensitivity or load dependence of relaxation has previously been used by several authors (4, 5, 6, 8, 22). This concept reflects the complex load-bearing capacity of cardiac muscle relaxing to its initial length. It was characterized by an overall time course of relaxation that was strikingly affected either by the afterload level or by an abrupt load clamp. Therefore, isometric relaxation phases appeared to be well separated over their largest portion for each load. This phenomenon was shown in a series of afterloaded twitches (Fig. 2*A*) and in twitches during which abrupt load clamps were imposed (Fig. 2*B*). Marked differences could be shown in the isometric time course of relaxation of afterloaded twitches. This phenomenon was observed in all rat papillary muscles both in controls and in chronically overloaded heart muscles. Such behavior of relaxation is not observed in frog ventricular strip in which it has been established that relaxation is governed by a load-insensitive mechanism. In frog heart, changes in loading conditions could not induce any difference in the time course of isometric relaxation as all twitches coincided at their ends (Fig. 2, *C* and *D*).

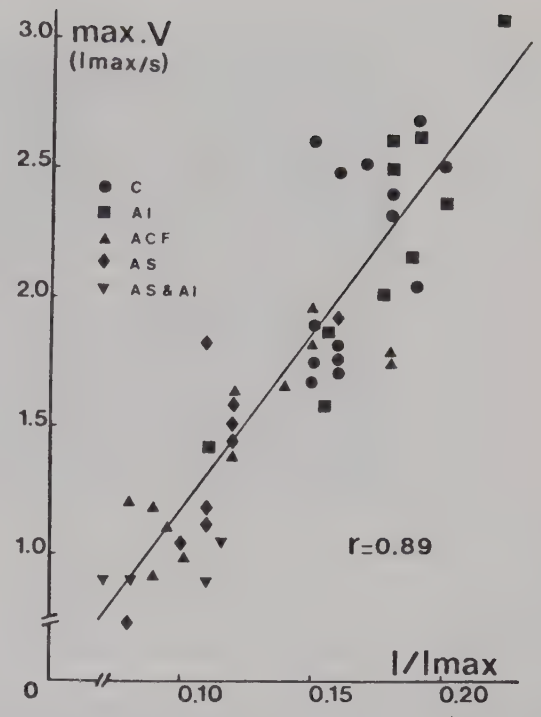



FIG. 1. Relationship between maximum isotonic velocity of relaxation of preloaded twitch ($l_{max}$/s) on *ordinate* and total extent of isotonic shortening at time to peak shortening in the same twitch ($l/l_{max}$) on *abscissa.* Linear regression analysis: maximum lengthening velocity = 13.7 $l/l_{max}$ − 0.22; $r = 0.89$, $P < 0.001$. C, control rats; AI, aortic insufficiency; ACF, aortocaval fistula; AS, aortic stenosis.

To quantify the degree of load dependence of relaxation, an index has previously been proposed in terms of the ratio of two areas (22): isotonic area/isometric area (Fig. 3). Isotonic area is the area limited by the afterload force vs. time trace at 50% of the isometric peak tension at $L_{max}$. Isometric area is the area under the force vs. time trace in the isometric twitch below the same level of load. This quantified expression for load sensitivity has been shown to be 0.8 in load-sensitive rat papillary muscle and to tend to approach 1 in load-insensitive frog ventricular strip. Table 1 shows the isotonic area-isometric area ratio for the five groups of rats. No significant difference appeared after statistical analysis of variance between normal and hypertrophied hearts with a 95% $O_2$-5% $CO_2$ gassed Krebs-Ringer solution. Whatever the stage of cardiac hypertrophy and heart failure, no quantitative modification of load sensitivity of relaxation could be induced by chronic overloading. However, the isotonic area-isometric area ratio was significantly higher in frog ventricular strips (0.94 ± 0.04) than in normal rats.

*Effects of acute hypoxia and reoxygenation of isolated rat papillary muscles.* Both in controls and in hypertro

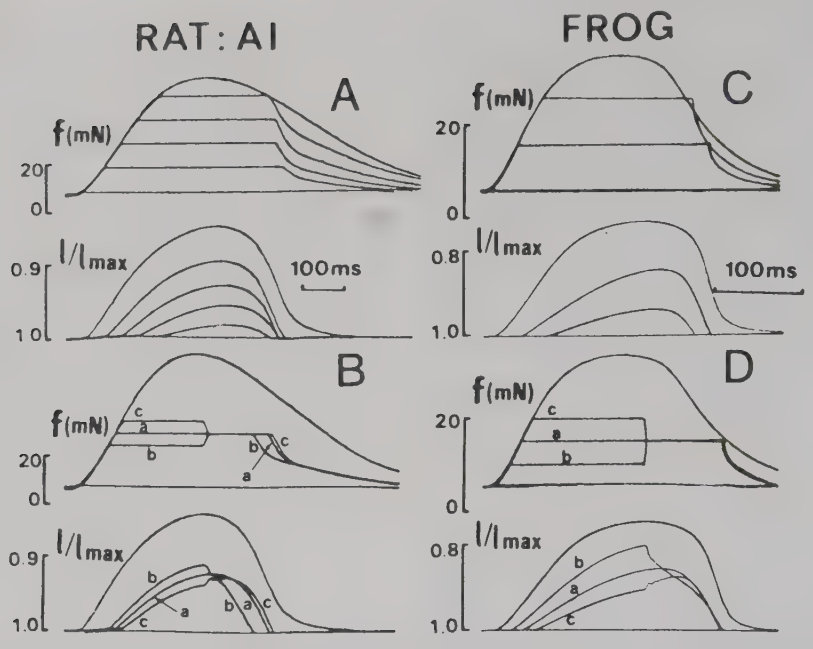



FIG. 2. *Panels A–D*: force (top trace) and shortening length (bottom trace) plotted as function of time. *Panels A* and *B*, typical rat cardiac papillary muscle overloaded by aortic insufficiency. *Panels C* and *D*, typical mechanical curves of frog ventricular strip. In *A* and *C*, a series of superimposed afterloaded isotonic contractions against various loads, i.e., from an isotonic twitch at preload only, then with different afterloads up to a full isometric twitch. In *A*, isotonic twitches always over before isometric control beat; this characterizes load-dependent relaxation, commonly observed in mammalian heart. In *C*, very little differences are seen in time course of relaxation traces of different afterload contractions up to isometric state; relaxation almost coincided with isometric relaxation, characterizing load-independent relaxation of frog heart. In *B* and *D*, loading step (twitch b) and unloading step (twitch c) of the same magnitude were imposed at same time during contraction. Twitch a, control afterloaded isotonic contraction to which muscle was clamped. In overloaded heart muscle (*B*), load clamp induced a strikingly different time course in relaxation traces of the 3 twitches (a, b, c), characterizing load-sensitive relaxation of mammalian heart. In *D*, load clamp in frog heart did not induce any difference in subsequent time courses of load insensitive relaxation, almost coinciding with isometric twitch. Typical load-dependent relaxation (*panels A* and *C*) was observed in all hearts of the 5 groups without any difference in hypertrophied heart muscles as compared with normal rat papillary muscles.

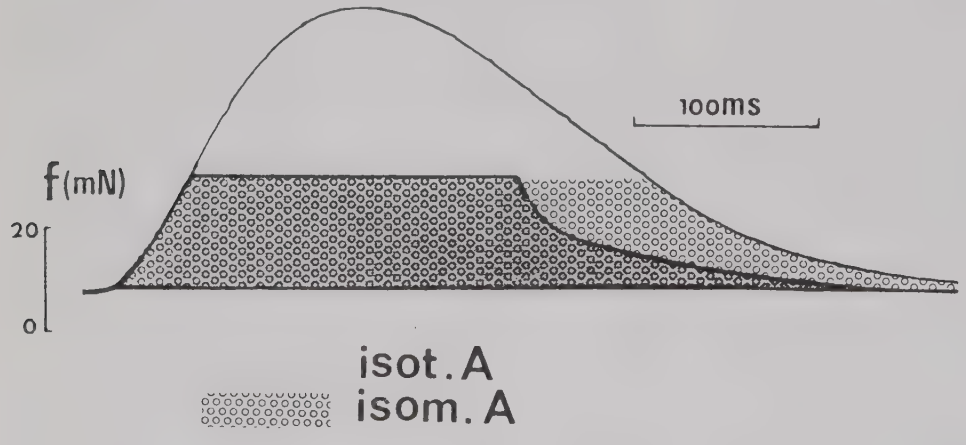



FIG. 3. Isotonic area (isot A)-isometric area (isom A) ratio. See text for isot A (*shaded area*) and isom A (*area with open circles*). This ratio, varying from 0.8 in rat heart muscle to 0.95 in frog ventricular strip, has previously been established as a very discriminant expression of load dependence.

phied heart muscles acute hypoxia rapidly resulted in an impairment of contractile performance. When the supply of oxygen was withdrawn, maximum velocity of contraction, maximum extent of isotonic shortening, peak isometric tension, and maximum velocity of isotonic relaxation quickly diminished (Fig. 4*B*) as compared with normoxic conditions (Fig. 4*A*). After a 10-min period of hypoxia heart muscles exhibited a decrease in these mechanical parameters, but load dependence of relaxation was still present. If heart muscle was reoxygenated at this stage mechanical recovery was complete. Load dependence of relaxation disappeared only when hypoxia was sufficiently prolonged during about 20–25 min, in hypertrophied heart muscles (Fig. 4*B*). At this stage reoxygenation still resulted in complete recovery of the mechanical function, particularly of the load sensitivity of relaxation (Fig. 4*C*). Thus this mechanical property of relaxation, which was always persistent during chronic cardiac hypertrophy and heart failure, was inhibited in a reversible way after an adequate hypoxic period. When hypoxia was prolonged more than 30 min the recovery of myocardial function after reoxygenation was substantially impaired.

## DISCUSSION

This work shows that *1*) the load-dependence phenomenon was quantitatively unaffected during the process of

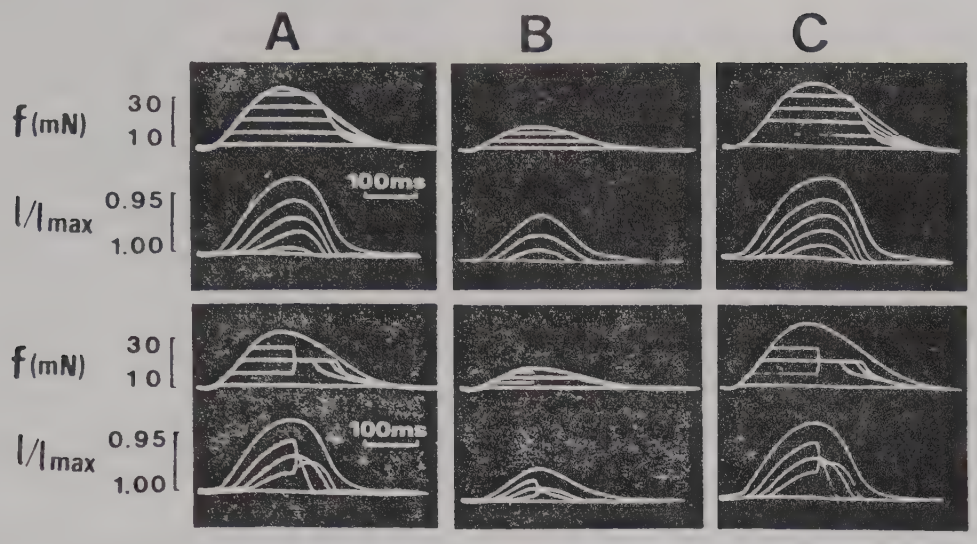



FIG. 4. Effect of hypoxia. *Panels A–C* subdivided in 2 insets. In each inset force (*top trace*) and shortening (*bottom trace*) plotted as a function of time. In *upper inset* different contractions were afterloaded from a preloaded twitch at $l_{max}$, then with different afterloads up to a full isometric twitch. In *lower inset* loading step and unloading step of same magnitude were imposed as in Fig. 2 at the same time during twitch. *A*: typical load-dependent relaxation of a normally oxygenated rat papillary muscle chronically overloaded by aortocaval fistula. *B*: after a 25-min period of hypoxia mechanical parameters of contraction phase ($V_{max}$, total extent of isotonic shortening, isometric tension, $+dT/dt_{max}$) were drastically decreased as well as parameters of relaxation ($-dL/dt_{max}$, $-dT/dt_{max}$). Furthermore, load dependence of relaxation disappeared because no difference could be seen in the time course of relaxation traces both in series of afterloaded twitches (upper inset of *panel B*) and after load-clamp steps (lower inset of *panel B*). *C*: reoxygenation in normal conditions again induced load sensitivity of relaxation, and recovery of myocardial function was almost complete as in *A*.

hypertrophy, whereas maximum velocity of isotonic relaxation and maximum rate of tension fall were drastically affected according to the type of chronic cardiac overloading; *2*) maximum velocity of relaxation of preloaded twitch was linearly related to total extent of shortening; and *3*) parallel decreases were observed among maximum velocity of lengthening, maximum velocity of shortening, and total extent of shortening. These results emphasize the role of the sarcoplasmic reticulum in the beat-to-beat $Ca^{2+}$ regulation during cardiac hypertrophy. Indeed, it is well known that in skinned cardiac cells of the normal rat a correlation is observed between parameters quantifying the rate of $Ca^{2+}$ accumulation by the sarcoplasmic reticulum (measured by the frequency and the rate of relaxation of the phasic contractions) and the amount of $Ca^{2+}$ released from the sarcoplasmic reticulum (measured by the tension amplitude of cyclic contractions) (13). This positive correlation persists after ionic modifications such as varying pH or after administering drugs such as adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate (10–12). These observations are corroborated in comparison of a range of adult mammalian cardiac tissues, from rat ventricle to rabbit ventricle, in which the progressive decrease in the amount of $Ca^{2+}$ release by the sarcoplasmic reticulum follows the progressive decrease in the rate of $Ca^{2+}$ reaccumulation by the sarcoplasmic reticulum (13). These results reveal parallel modifications in mechanical parameters of both contraction and relaxation and in functional capabilities of the sarcoplasmic reticulum. Other mechanical studies have exhibited in several mammalian species parallel changes between the course of cardiac relaxation and alterations in contractility induced by cardiac hypertrophy (1, 15, 19, 26). On the other hand, many changes have been described (9) in membrane structures during cardiac hypertrophy and heart failure, particularly at the level of the sarcoplasmic reticulum. Most of these studies were conducted in vitro in microsomal vesicles and reported a reduction in $Ca^{2+}$ uptake (14, 17), in $Ca^{2+}$ binding (28), and in $Ca^{2+}$-stimulated ATPase activity (14, 24). Depressed function of isolated sarcoplasmic reticulum has also been demonstrated in impaired nonischemic (23) and ischemic (27) human myocardium. These papers strengthen the idea that a diminution of the capabilities of the sarcoplasmic reticulum to reaccumulate and release $Ca^{2+}$ could partly account for the fall in myocardial performance in *groups 3–5*. Mechanical parameters were not decreased in *group 2*, suggesting that a notable degree of cardiac hypertrophy and increased TPS (1, 19) would not be incompatible with a normal mechanical function of sarcoplasmic reticulum after four months of chronic volume overload induced by aortic insufficiency.

Furthermore, in the five groups of rats we did not find any quantitative modification of the load dependence of relaxation revealed by a constant isotonic area-isometric area ratio equal to 0.7. Previous studies have shown that load sensitivity of relaxation coincides with efficient calcium-sequestering systems in mammalian cardiac muscle (4, 5, 22) and in frog (18) and rat skeletal muscle (unpublished observations). Thus in rat papillary muscle this property disappears with 3 mM caffeine (22), whereas this drug is known to partially inhibit the sarcoplasmic reticulum (2, 30). In cat papillary muscle the disappearance of load sensitivity requires high calcium (10 mM), caffeine (10 mM), or tetanic stimulation (22). Furthermore, load dependence is not observed in single cardiac cell in which the membrane systems have been biochemically destroyed with BRIJ-58 (4), whereas load dependence exits in isolated spontaneously beating cardiac cells in which the sarcoplasmic reticulum is assumed to continue to function (22). In this single cellular preparation the isometric area-isotonic ratio is 0.8 (22). Load depend-

ence is not observed in frog ventricular muscle (5), which is known to have a sparse sarcoplasmic reticulum (29). It is, however, possible to induce load-sensitivity (low sodium, high calcium, ouabain) in frog ventricular strip (6, 22). In frog myocardium the isotonic area-isometric area ratio diminishes from about 0.92 to 0.80 when external calcium concentration increases from 4.5 to 7 mM. Frog ventricular strips become load dependent when the ratio reaches 0.8, a value observed in both normal and hypertrophied rat myocardium (Table 1). If $Ca^{2+}$ transport capabilities involved in the regulation of the load dependence were affected during chronic cardiac overloading, an increase of the isotonic area-isometric area ratio would be expected. In rat heart muscle the invariability of this parameter, only altered by anoxia, suggests the existence of an intracellular regulation that could maintain its value at 0.8 during cardiac hypertrophy. The localization in the sarcoplasmic reticulum of such a mechanism might be discussed. Morphological changes have been described during cardiac hypertrophy. As myocardial cells enlarge by constricting the ascending aorta in the rat for periods of 1–50 days, both the absolute area of sarcotubular membrane and the sarcotubular surface area per unit of cell volume increase (25). In contrast, the area of sarcotubular membrane per unit of myofibrillar volume remains constant (25). These results could partly explain the constancy of the isotonic area-isometric area ratio during myocardial cell growth. An increase in volume and surface area of sarcoplasmic reticulum has been shown in cardiomyopathic hamsters (21). Other intracellular calcium-sequestering sites, such as subsarcolemmal sites or mitochondria might also participate to preserve the load sensitivity of relaxation during cardiac hypertrophy. The role of sarcolemmal sites in the control of contraction and relaxation of normal heart muscle has been widely studied (20), but little is known about their function in relaxation processes of hypertrophied heart muscles. A hypothetical physiological function of mitochondria (7) in the relaxation of heart muscle is controversed (13). In impaired nonischemic human heart muscle, an enhanced active $Ca^{2+}$ transport occurs in mitochondrial membranes, accompanied by a depressed capacity of $Ca^{2+}$ transport across the sarcoplasmic reticulum membranes (23). Therefore, in pathological conditions, a possible role of both sarcolemmal sites and mitochondria cannot be completely excluded.

In the five groups of rats an acute hypoxia lasting up to 30 min was necessary to abolish load dependence of relaxation, which was reversible in a few minutes. Disappearance of load sensitivity has recently been described in the normal rat during hypoxia (8). The more likely causes of the fall in myocardial performance during the reversible phase of hypoxia would seem to depend on a malfunction of excitation-contraction coupling and failure of subcellular organelles to regulate the cytosolic calcium concentration. The disturbances would appear to be partly caused by an inadequate supply of energy or to an accumulation of inhibiting metabolites. Consequently, it was expected that the sarcoplasmic reticulum would accumulate and release calcium relatively slowly during acute hypoxia. As regards the load dependence of relaxation, cardiac hypertrophy in normoxic conditions was never able to induce such alterations in calcium-accumulation mechanisms by the sarcoplasmic reticulum, even during myocardial failure.

In conclusion, during cardiac hypertrophy and heart failure depressed fluxes of calcium through the membrane of the sarcoplasmic reticulum might account for the decrease of maximum velocity of relaxation and parallel decrease of maximum velocity of contraction and total extent of shortening. Moreover, homeostasis of load dependence involved in the load-bearing capacity of the muscle and in the time behavior of relaxation remained normally regulated during cardiac hypertrophy and heart failure and could result from an efficient enough sarcoplasmic reticulum during cardiac hypertrophy, even at the ultimate development of congestive heart failure.

The authors gratefully acknowledge the secretarial expertise provided by M. T. Dronne in the preparation of this manuscript and A. Orszag for the use of laboratory facilities.

This work was supported in part by Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique Grant 78.7.2585 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ATP 63.78.95.

Received 1 June 1981; accepted in final form 16 November 1981.

REFERENCES

1. Bing, O. H. L., S. Matsushita, B. L. Fanburg, and H. J. Levine. Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. *Circ. Res.* 28: 234–245, 1971.
2. Blinks, J. R., C. B. Olson, B. R. Jewell, and P. Braveny. Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart. *Circ. Res.* 30: 367–392, 1972.
3. Brutsaert, D. L., and V. A. Claes. Onset of mechanical activation of mammalian heart muscle in calcium- and strontium-containing solutions. *Circ. Res.* 35: 345–357, 1974.
4. Brutsaert, D. L., V. A. Claes, and N. M. De Clerck. Relaxation of mammalian single cardiac cells after pretreatment with the detergent BRIJ-58. *J. Physiol. London* 283: 481–491, 1978.
5. Brutsaert, D. L., N. M. De Clerck, M. A. Goethals, and P. R. Housmans. Relaxation of ventricular cardiac muscle. *J. Physiol. London* 283: 469–480, 1978.
6. Brutsaert, D. L., P. R. Housmans, and M. A. Goethals. Dual control of relaxation. Its role in the ventricular function in the mammalian heart. *Circ. Res.* 47: 637–652, 1980.
7. Carafoli, E. Mitochondria, $Ca^{2+}$ transport and the regulation of heart contraction and metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 7: 83–89, 1975.
8. Chuck, L. H., M. A. Goethals, W. W. Parmley, and D. L. Brutsaert. Load-insensitive relaxation caused by hypoxia in mammalian cardiac muscle. *Circ. Res.* 48: 797–803, 1981.
9. Dhalla, N. S., P. K. Das, and G. P. Sharma. Subcellular basis of cardiac contractile failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 363–385, 1978.
10. Fabiato, A., and F. Fabiato. Relaxing and inotropic effects of cyclic AMP on skinned cardiac cells. *Nature London* 253: 556–558, 1975.
11. Fabiato, A., and F. Fabiato. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol. London* 249: 469–495, 1975.
12. Fabiato, A., and F. Fabiato. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* 40: 119–129, 1977.
13. Fabiato, A., and F. Fabiato. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and newborn rat ventricles. *Ann. NY Acad. Sci.* 507: 491–522, 1978.
14. Gertz, E. W., M. L. Hess, R. F. Lain, and F. N. Briggs. Activity

of the vesicular calcium pump in the spontaneously failing heart-lung preparation. *Circ. Res.* 20: 477–484, 1967.

15. Hamrell, B. B., and N. R. Alpert. The mechanical characteristics of hypertrophied rabbit cardiac muscle in the absence of congestive heart failure. *Circ. Res.* 40: 20–25, 1977.
16. Hatt, P. Y., K. Rakusan, P. Gastineau, and M. Laplace. Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-caval fistula in the rat). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11: 989–998, 1979.
17. Ito, Y., J. Suko, and C. A. Chidsey. Intracellular calcium and myocardial contractility. V. Calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 6: 237–247, 1974.
18. Jewell, B. R., and D. R. Wilkie. The mechanical properties of relaxing muscle. *J. Physiol. London* 152: 30–47, 1960.
19. Jouannot, P., and P. Y. Hatt. Rat myocardial mechanics during pressure-induced hypertrophy development and reversal. *Am. J. Physiol.* 229: 355–364, 1975.
20. Langer, G. A. The structure and function of the myocardial cell surface. *Am. J. Physiol.* 235 (*Heart Circ. Physiol.* 4): H461–H468, 1978.
21. Lazarus, M. L., J. A. Colgan, and H. G. Sachs. Quantitative light and electron microscopic comparison of the normal and cardiomyopathic Syrian hamster heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 8: 431–441, 1976.
22. Lecarpentier, Y. C., L. H. S. Chuck, P. R. Housmans, N. M. De Clerck, and D. L. Brutsaert. Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 237 (*Heart Circ. Physiol.* 6): H455–H460, 1979.
23. Lentz, R. W., C. E. Harrison, Jr., J. D. Dewey, D. A. Barnhorst, G. K. Danielson, and J. R. Pluth. Functional evaluation of cardiac sarcoplasmic reticulum and mitochondria in human pathologic states. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 3–30, 1978.
24. Mead, R. J., M. B. Peterson, and J. D. Welty. Sarcolemmal and sarcoplasmic reticular ATPase activities in the failing canine heart. *Circ. Res.* 29: 14–20, 1971.
25. Page, E., and L. P. McCallister. Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *Am. J. Cardiol.* 31: 172–181, 1973.
26. Parmley, W. W., and E. H. Sonnenblick. Relation between mechanics of contraction and relaxation in mammalian cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 216: 1084–1091, 1969.
27. Schwartz, A., L. A. Sordahl, M. L. Entman, J. C. Allen, Y. S. Reddy, M. A. Goldstein, R. J. Luchi, and L. E. Wyborny. Abnormal biochemistry in myocardial failure. *Am. J. Cardiol.* 32: 407–422, 1973.
28. Sordahl, L. A., W. B. McCollum, W. G. Wood, and A. Schwartz. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am. J. Physiol.* 224: 497–502, 1973.
29. Staley, N. A., and E. S. Benson. The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. *J. Cell. Biol.* 38: 99–113, 1968.
30. Weber, A., and R. Herz. Relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol.* 52: 750–759, 1968.

Article soumis aux Archives des maladies du coeur.

# LA RELAXATION CARDIAQUE AU COURS DE L'HYPERTROPHIE MYOCARDIQUE CHRONIQUE EXPERIMENTALE : LE ROLE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE.

Y. LECARPENTIER, J. L. MARTIN*, G. GRILLON*, A. DOS SANTOS*, A. ANTONETTI* et P. Y. HATT

I.N.S.E.R.M. U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes et *L. O. A., E.N.S.T.A., Ecole Polytechnique, 91120 Palaiseau.

Ce travail a été financé par une A.T.P. I.N.S.E.R.M. n° 63-78-95 et un C.R.L. I.N.S.E.R.M. n° 82-50-45.

Tirés à part : Dr. Y. LECARPENTIER, I.N.S.E.R.M. U2, Hôpital Léon Bernard, 94450 Limeil-Brévannes.

RESUME

La phase de relaxation a été étudiée sur des coeurs de rats normaux et soumis à des surcharges myocardiques chroniques de pression et/ou de volume (sténose de l'aorte abdominale, insuffisance aortique, fistule aorto-cave) et sur des coeurs de rats spontanément hypertendus dont certains ont de plus subi une fistule aorto-cave. Quatre indices quantifiant la phase de relaxation ont été retenus : la vitesse maximale de relaxation lors de la contraction avec précharge seule, le pic négatif de la dérivée de la tension isométrique et deux autres indices testant la sensibilité de la phase de relaxation en fonction des conditions de charge. Les deux premiers indices s'avèrent abaissés au cours des surcharges myocardiques chroniques, particulièrement au cours des fistules aorto-caves et lors des surcharges mixtes. A l'inverse, les deux autres indices, quantifiant le degré de sensibilité à la charge de la relaxation, par deux méthodes différentes ne montrent aucune différence significative entre les coeurs soumis à une surcharge chronique et les témoins, alors qu'ils sont modifiés après hypoxie aiguë. Ces deux indices sont liés au développement morphologique et à l'état fonctionnel du réticulum sarcoplasmique.

Ces résultats suggèrent que la vitesse de recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique est diminuée au cours des surcharges myocardiques chroniques mais que le myocarde conserve la propriété de réguler temporellement la phase de relaxation selon le niveau de la charge totale. Cette propriété disparait reversiblement après hypoxie, le coeur se comportant alors comme du myocarde de grenouille dans lequel le réticulum sarcoplasmique est quasi-absent.

Mots-clés : Relaxation. Hypertrophie myocardique. Réticulum sarcoplasmique.

## INTRODUCTION

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la phase de relaxation cardiaque demeurent actuellement moins bien connus que ceux qui président à la phase de contraction. Le rôle du réticulum sarcoplasmique dans l'une et l'autre de ces phases est maintenant bien établi (4, 7). Celui-ci recapte le calcium, ce qui abaisse suffisamment la concentration calcique myoplasmique pour ne plus engendrer l'activation de nouveaux ponts actine-myosine et relaxer les fibres myocardiques. Le mode selon lequel se déroule la relaxation est intimement lié au développement morphologique et fonctionnel du réticulum sarcoplasmique. Ainsi le tissu cardiaque de mammifère se comporte-t-il durant la phase de relaxation de façon très élaborée lorsque les conditions de charge varient, comparé à celui de la grenouille dont le réticulum sarcoplasmique est fort peu développé (2, 20). Par ailleurs, de nombreuses anomalies biochimiques ont été décrites au niveau du réticulum sarcoplasmique au cours de l'hypertrophie cardiaque et de la défaillance cardiaque congestive. Bien que des divergences subsistent, la plupart d'entre elles montrent que le recaptage du calcium connu sous les termes anglo-saxons de "binding" et d'"uptake", de même que l'activité $Ca^{2+}$-ATPasique du réticulum diminuent au cours de l'hypertrophie cardiaque (6, 10, 13, 17, 19). Nous avons étudié la relaxation du myocarde de rat, après surcharge chronique de pression et/ou de volume et plus précisément les paramètres testant la sensibilité de la relaxation en fonction des conditions de charge. Ces paramètres au plan mécanique sont un reflet du comportement fonctionnel du réticulum sarcoplasmique. Deux méthodes différentes (5, 11) ont été utilisées pour quantifier le degré de "sensibilité à la charge" de la phase de relaxation chez des rats normaux et spontanément hypertendus, soumis ou non à une surcharge myocardique chronique.

## METHODES

Différents types d'hypertrophie myocardique ont été réalisés chez le rat, après surcharge chronique isolée de pression

ou de volume d'une part, et après surcharge chronique associant les deux processus d'autre part.

Cette étude a porté sur des muscles papillaires de ventricule gauche de rats Wistar répartis selon six groupes. Groupe 1 : témoins (nombre d'animaux (n) = 18) ; groupe 2 : insuffisance aortique (IA) (n = 9) ; groupe 3 : fistule aorto-cave (FAC) (n = 12) (9) ; groupe 4 : sténose aortique (SA) (n = 9) (1) ; groupe 5 : sténose aortique associée à une insuffisance aortique (SA + IA) (n = 4) ; groupe 6 : rat spontanément hypertendu (SHR) (n = 8). Ce groupe est subdivisé en deux sous-groupes : groupe 6 A : rat spontanément hypertendu (n = 4) et groupe 6 B : rat spontanément hypertendu associé à une fistule aorto-cave (n = 4).

Les muscles papillaires sont rapidement excisés du ventricule gauche et disposés verticalement dans une chambre thermostatée à 29 °C contenant (mM) : NaCl 118 ; KCl 4,7 ; $MgSO_4$ $7H_2O$ 1,2 ; $KH_2PO_4$ 1,1 ; $NaHCO_3$ 24 ; $CaCl_2$ $6H_2O$ 2,5 ; glucose 4,5. La solution est oxygénée avec 95 % $O_2$ et 5 % $CO_2$, pH 7,4. Les muscles sont stimulés six fois par minute à l'aide de deux électrodes de platine et se stabilisent progressivement durant une période d'une heure. L'ensemble du protocole est effectué à Lmax, longueur initiale du muscle correspondant à l'apex de la courbe tension isométrique-longueur initiale. Le transducteur de force et de longueur, antérieurement décrit (11), consiste en un système électro-magnétique soumis à un rétro-contrôle qui détermine la charge totale instantanée imposée au muscle. Cet appareillage donne en fonction du temps la longueur et la force du muscle, et la dérivée de ces deux variables en fonction du temps. De plus un système électronique permet de changer brusquement la charge du muscle, d'amplitude et de durée variables.

## RESULTATS

Le degré d'hypertrophie cardiaque est quantifié par le rapport poids du coeur sur poids du corps normalisé par rapport à la valeur moyenne du groupe témoin : groupe 1 témoin : 0 % ;

groupe 2 : 38 % ; groupe 3 : 78 % ; groupe 4 : 35 % ; groupe 5 : 54 % ; groupe 6 A : 42 % ; groupe 6 B : 65 %. La durée de la surcharge en mois est de 3,5 $\pm$ 0,5 dans le groupe 2, 14 $\pm$ 2 dans le groupe 3, 4 $\pm$ 1 dans le groupe 4 , 12 $\pm$ 2 dans le groupe 5 et 7 $\pm$ 1 dans le groupe 6 B. Le degré d'hypertrophie s'avère élevé dans les surcharges mixtes (IA + SA et SHR + FAC) et dans les FAC seules, et l'est modérément dans les surcharges de pression pure (SA, SHR) et les IA seules. Dans certains cas, le poids du coeur double, voire triple, par rapport aux témoins notamment dans les groupes 3, 5 et 6 B alors comparable au degré d'hypertrophie myocardique parfois observé en pathologie humaine. La majeure partie de l'hypertrophie s'acquiert généralement lors des deux premiers mois qui suivent la création de la surcharge mécanique chronique ce qui indique, du moins chez le rat, que le degré d'hypertrophie compensatrice à long terme dépend plus du type de la surcharge que de sa durée.

Quatre indices ont été retenus pour quantifier du point de vue mécanique la phase de relaxation : la vitesse maximale de relaxation de la contraction avec précharge seule (- maxV), le pic négatif de la dérivée de la tension totale isométrique normalisé par rapport à la section du muscle (- dT/dt max/$mm^2$) et deux indices testant l'influence des variations de conditions de charge sur le cours de la relaxation (A.isot/A.isom et tRi, tous deux décrits ci-dessous). La figure 1 montre les valeurs de ces indices dans les six groupes de rats. Les deux premiers indices (- maxV : Fig. 1 encart A et - dT/dt max/$mm^2$ : Fig. 1 encart B) s'avèrent diminués dans tous les groupes soumis à une surcharge chronique et plus particulièrement lors de surcharges mixtes (groupe 5 et 6 B) et dans les fistules aorto-caves. Seule - maxV dans le groupe 2 ne diffère pas significativement de la valeur du groupe témoin, alors que le degré d'hypertrophie myocardique y est déjà notable. La baisse de dT/dt max/$mm^2$ est essentiellement liée à l'augmentation de la

section des muscles papillaires.

Les encarts C et D de la Figure 1 montrent deux indices récemment introduits A.isot/A.isom et tRi, quantifiant la "sensibilité" de la relaxation aux variations de charge totale (5, 11). Ce concept traduit la capacité du tissu cardiaque à moduler le cours de la phase de relaxation lorsque l'on fait varier la charge totale. La Figure 2 illustre à l'aide d'un schéma le comportement mécanique très différent en termes de sensibilité à la charge, du myocarde de rat (Fig. 2 A) par rapport à celui de la grenouille (Fig. 2 B). La fin de la phase de relaxation isotonique dépend des conditions de charge et notamment se termine chez les mammifères à des instants différents lorsqu'on applique au muscle de brusques altérations de la charge totale (Fig. 2 A, contractions a, b, c). La charge totale des contractions a et c est brusquement clampée au même niveau de charge totale que lors de la contraction b ; le moment de cette altération de charge coïncide sensiblement au pic de tension isométrique. La fin de la phase de relaxation isotonique survient bien avant la relaxation de la contraction entièrement isométrique considérée au même niveau de charge totale (confère légende de la Figure 2 A, contraction d point R). Inversement dans le myocarde de grenouille, les phases de relaxation isométrique débutent au même instant et ne sont pas influencées par les variations de la charge totale. Cela est illustré sur la Figure 2 B où les contractions a, b et c passent par le point R de la contraction isométrique d. Ce phénomène a récemment été quantifié en utilisant les deux indices A.isot/A.isom (11) et tRi (5). Tous deux sont des indices indépendants l'un l'autre et sans dimensions, le premier étant un rapport de deux surfaces, le second un rapport de deux temps (Figure 2 C). A.isot (aire isotonique) est la surface limitée par la contraction isotonique dont la charge totale s'effectue à 50 % de la tension isométrique totale à Lmax ; A.isom (aire isométrique) est la surface limitée

par la contraction isométrique au-dessous du niveau de charge totale égal à 50 % de la tension totale isométrique à Lmax (Figure 2 C). Cet indice est égal à 0,80 dans le myocarde de rat (Fig. 2 A). Il augmente et tend vers 1 lorsque le tissu cardiaque devient progressivement moins sensible aux variations de charge totale comme le myocarde de grenouille pour lequel ce rapport est égal à 0,95 (Figure 2 B). L'indice tRi 50 % (temps de relaxation isométrique) est le rapport du temps au bout duquel s'achève la phase de relaxation isométrique de la contraction post-chargée à 50 % de la valeur de la tension totale isométrique à Lmax, et du temps mis par la contraction isométrique pour décroître jusqu'à cette valeur (Figure 2 C). Ce rapport tRi = $t_1/t_2$ est égal à 0,83 dans le myocarde de rat et à 1 dans celui de grenouille. Les encarts C et D de la Figure 1 montrent respectivement les valeurs de A.isot/A.isom et de tRi 50 %. Les valeurs de chacun de ces deux indices ne diffèrent pas significativement entre elles, dans les six groupes étudiés, après analyse statistique de la variance.

De plus, si l'on soumet les muscles papillaires normaux et pathologiques à une hypoxie aiguë durant environ une demi heure en permutant le mélange gazeux 95 % $O_2$, 5 % $CO_2$ par un mélange 95 % $N_2$, 5 % $CO_2$ la sensibilité aux variations de charge disparaît, et les deux indices A.isot/A.isom et tRi tendent vers 1. Ce fait est illustré sur la Figure 3 B représentant un muscle papillaire de rat soumis à une surcharge cardiaque chronique qui après 25 mn d'hypoxie ne réagit plus aux variations de charge et dont le comportement devient similaire à celui du myocarde de grenouille (Figure 2 B). Après retour en milieu normalement oxygéné, cet état de fait est entièrement réversible.

## DISCUSSION

Au cours de l'hypertrophie myocardique expérimentale du rat, les paramètres mécaniques caractérisant la phase de re-

laxation cardiaque évoluent selon différentes modalités. Les uns (- maxV et - dT/dt max/$mm^2$) sont altérés, et leur décroissance respective est liée au type de la surcharge chronique (Figure 1, encarts A et B). Les autres (A.isot/A.isom et tRi 50 %) ne subissent aucune modification significative quel que soit le degré, la durée et le type de la surcharge myocardique en cause. Cette dissociation laisse penser que ces deux groupes de paramètres sont gouvernés par des mécanismes intracellulaires indépendants. Fabiato et Fabiato ont montré que les contractions spontanées de myocytes dont le sarcolemme avait préalablement été pelé, étaient déclenchées par une extrusion de calcium hors du réticulum sarcoplasmique (7). L'amplitude de la force et la vitesse de relaxation de ces contractions spontanées dépendent de la charge calcique acquise par le réticulum sarcoplasmique. De plus, ces deux paramètres caractérisant la phase de contraction pour le premier et la phase de relaxation pour le second, varient dans le même sens et reflètent indirectement la quantité de calcium extrudé puis recapté par le réticulum sarcoplasmique (8). Cela suggère un couplage complexe entre les phases de contraction et de relaxation. La baisse de la vitesse de relaxation au cours de l'hypertrophie cardiaque témoigne probablement de la diminution des flux calciques alors observée ("binding", "uptake", $Ca^{2+}$-ATPase activité) à travers la membrane du réticulum sarcoplasmique (6, 10, 13, 17, 19).

Au cours des surcharges myocardiques chroniques du rat, la répartition isozymique de la myosine se modifie au profit de l'isoenzyme lent $V_3$(15). Il existe par ailleurs, durant l'hypertrophie cardiaque chronique chez le rat, un parallélisme entre les paramètres mécaniques de contraction et les paramètres biochimiques. En effet la vitesse maximale de raccourcissement est linéairement liée au pourcentage d'isoenzymes $V_1$ (rapide) et $V_3$ (lent) de la myosine (14, 18), alors que A.isot/A.isom et tRi ne varient pas. D'autre part, A.isot/

A.isom et tRi sont modifiés après hypoxie aiguë, qui de plus induit une diminution plus importante de la vitesse de relaxation que de la vitesse de contraction. Cela suggère que la vitesse de relaxation n'est pas régulée, du moins directement, par la répartition en pourcentage des isoenzymes lent et rapide de la myosine. Il a été établi que le concept de modulation temporelle de la phase de relaxation en fonction des conditions de charge était lié aux capacités fonctionnelles du réticulum sarcoplasmique à recapter le calcium. En effet, cette propriété n'est pas physiologiquement observée dans le myocarde de grenouille (2, 11) connu pour sa pauvreté en réticulum (20). Elle apparaît à l'inverse de façon nette dans les muscles papillaires de mammifères qui sont riches en réticulum sarcoplasmique comme ceux de rat, de chat, ou de lapin (2), de même que dans la cellule cardiaque isolée de mammifère (11). Elle disparaît dans le myocarde de mammifère après inhibition partielle de l'activité fonctionnelle du réticulum sarcoplasmique par la caféïne (11, 21) et dans le myocyte isolé après destruction biochimique du réticulum sarcoplasmique par le BRIJ 58 (3). L'hypoxie diminue et ralentit les flux calciques à travers la membrane du réticulum et supprime cette propriété (Fig. 3) (5) et les deux indices A.isot/A.isom et tRi tendent vers 1. Durant la relaxation, l'absence de sensibilité à la charge est également observée dans le myocarde de rat nouveau-né (observation personnelle). Cela corrobore le résultat de Fabiato et Fabiato montrant que le réticulum sarcoplasmique de rat n'est pas fonctionnel au jour de la naissance et ne le devient pleinement que vers la troisième semaine (8).

En conclusion, la vitesse maximale de relaxation diminue au cours de l'hypertrophie chronique expérimentale de rat, ce qui reflèterait les anomalies biochimiques observées in vitro dans le réticulum sarcoplasmique. Cependant, les mécanismes d'homéostase régulant la sensibilité de la relaxation en fonc-

tion des conditions de charge ne sont pas perturbés au cours des surcharges myocardiques chroniques. Ces mécanismes intimes intra-cellulaires demeurent inconnus et incitent à chercher de nouvelles techniques capables d'explorer plus directement, in vivo, le réticulum sarcoplasmique et de façon plus générale les flux intra-cellulaires de calcium. Le nombre grandissant de drogues modifiant les mouvements de calcium et actuellement très utilisées en clinique cardiologique constitue un argument important pour poursuivre les investigations dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE

1. BING, O.H.L., MATSUSHITA, S., FANBURG, B.L., LEVINE, H.J. : Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. Circ. Res., 28, 234, 1971.

2. BRUTSAERT, D.L., CLAES, V.A., De CLERCK, N.M. : Relaxation of mammalian single cardiac cells after pretreatment with the detergent BRIJ-58. J. Physiol. (London), 283, 481, 1978.

3. BRUTSAERT, D.L., De CLERCK, N.M., GOETHALS, M.A., HOUSMANS, P.R. : Relaxation of ventricular cardiac muscle. J. Physiol. (London), 283, 469, 1978.

4. BRUTSAERT, D.L., HOUSMANS, P.R., GUETHALS, M.A. : Dual control of relaxation : its role in the ventricular function in the mammalian heart. Circ. Res., 47, 637, 1980.

5. CHUCK, L.H., GOETHALS, M.A., PARMLEY, W.W., BRUTSAERT, D.L. : Load-insensitive relaxation caused by hypoxia in mammalian cardiac muscle. Circ. Res., 48, 797, 1981.

6. DHALLA, N.S., DAS, P.K., SHARMA, G.P. : Subcellular basis of cardiac contractile failure. J. Mol. Cell. Cardiol., 10, 363, 1978.

7. FABIATO, A., FABIATO, F. : Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Circ. Res., 40, 119, 1977.

8. FABIATO, A., FABIATO, F. : Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. Ann. N.Y. Acad. Sci., 307, 491, 1978.

9. HATT, P.Y., RAKUSAN, K., GASTINEAU, P., LAPLACE, M. : Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-caval fistula in the rat). J. Mol. Cell. Cardiol., 11, 989, 1979.

10. ITO, Y., SIKO, J., CHIDSEY, C.A. : Intracellular calcium and myocardial contractility. V. Calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit hearts. J. Mol. Cell. Cardiol., 6, 237, 1974.

11. LECARPENTIER, Y.C., CHUCK, L.H.S., HOUSMANS, P.R., De CLERCK, N.M., BRUTSAERT, D.L. : Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle. Am. J. Physiol., 237, H455, 1979.

12. LECARPENTIER, Y.C., MARTIN, J.L., GASTINEAU, P., HATT, P.Y. : Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure. Am. J. Physiol., 242, H855, 1982.

13. MEAD, R.J., PETERSON, M.B., WELTY, J.D. : Sarcolemmal and sarcoplasmic reticular ATPase activities in the failing canine heart. Circ. Res., 29, 14, 1971.

14. MERCADIER, J.J., LECARPENTIER, Y., DELCAYRE, C., LOMPRE, A.M., SWYNGHEDAUW, B., SCHWARTZ, K. : Mécanismes biochimiques de l'adaptation myocardique dans l'hypertrophie cardiaque. Arch. Mal. Coeur., 75, 1179, 1983.

15. MERCADIER, J.J., LOMPRE, A.M., WISNEWSKY, C., SAMUEL, J.L., BERCOVICI, J., SWYNGHEDAUW, B., SCHWARTZ, K. : Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. Circ. Res., 49, 525, 1981.

16. ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H., BRANDT, P.W. : Calcium binding and tension development in detergent treated muscle fibres. J. Gen. Physiol., 63, 168, 1974.

17. SCHWARTZ, A., SORDAHL, L.A., ENTMAN, M.L., ALLEN, J.C., REDDY, Y.S., GOLDSTEIN, M.A., LUCHI, R.J., WYBORNY, L.E. : Abnormal biochemistry in myocardial failure. Am. J. Cardiol., 32, 407, 1973.

18. SCHWARTZ, K., LECARPENTIER, Y., MARTIN, J. L., LOMPRE, A.M., MERCADIER, J.J., SWYNGHEDAUW, B. : Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. J. Mol. Cell. Cardiol., 13, 1071, 1981.

19. SORDAHL, L.A., McCOLLUM, W.B., WOOD, W.G. and SCHWARTZ, A. : Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. Am. J. Physiol., 224, 497, 1973.

20. STALEY, N.A., BENSON, E.S. : The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanism of excitation-contraction coupling. J. Cell. Biol., 38, 99, 1968.

21. WEBER, A., HERZ, R. : Relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. J. Gen. Physiol., 52, 750, 1968.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 - Quatre indices de relaxation sont calculés pour les six groupes de rats : encart A : vitesse maximale de relaxation de la contraction avec précharge seule ; encart B : pic négatif de la dérivée de la tension isométrique à Lmax ; encart C : A.isot/ A.isom (explicité dans la Figure 2 C) ; encart D : tRi (explicité dans la Figure 2 C).

Figure 2 - Encart A : courbes de tension en fonction du temps sur un muscle papillaire de rat. Quatre contractions (a, b, c, d) sont similairement préchargées à Lmax. La contraction b est post-chargée. La charge totale de la contraction a est inférieure à celle de la contraction b, puis est brusquement clampée au niveau b. La relaxation isométrique de la contraction a débute prématurément, comparée à celle de la contraction b. De même, la charge totale de la contraction c est supérieure à celle de la contraction b, puis est brusquement clampée au niveau b. La relaxation isométrique de c est modérément retardée par rapport à celle de la contraction b. La contraction d se déroule entièrement en mode isométrique. Le niveau R de la phase de relaxation isométrique de la contraction d correspond au niveau de la charge totale de la contraction b. Le début de la phase de relaxation isométrique est différent dans les trois contractions a, b et c et est distinct du point R. Cela illustre l'influence des variations de charge sur le cours des phases isotoniques et isométriques de la relaxation myocardique. Encart B : même protocole que dans l'encart A pour quatre contractions identiquement préchargées à Lmax. Il s'agit ici de myocarde de grenouille. Il faut noter que le point R coïncide

avec le moment où se termine la phase de relaxation isotonique des contractions a, b et c. Ainsi, le myocarde de grenouille se comporte-t-il différemment de celui de mammifère et n'est pas sensible aux variations de charge pour ce qui concerne la phase de relaxation. Encart C : schéma montrant le mode de calcul des indices A.isot/A.isom et tRi = $t_1/t_2$ calculés pour une contraction post-chargée à 50 % de la valeur de la tension isométrique à Lmax.

Figure 3 - Encart A : courbes de force (au-dessus) et de raccourcissement (au-dessous) en fonction du temps. Même protocole que dans la Figure 2, encart A. En normoxie, le myocarde de rat régule de façon complexe la relaxation lorsque les conditions de charge varient. Encart B : après 20 à 30 mn d'hypoxie, la sensibilité de la relaxation aux variations de charges disparaît et le myocarde de rat se comporte comme le tissu ventriculaire de grenouille (Fig. 2 B). Cet aspect est rapidement réversible en quelques minutes après restitution d'une oxygénation correcte (95 % $O_2$, 5 % $CO_2$). La vitesse maximale de relaxation lors de la contraction avec précharge seule (contraction e) diminue au cours de l'hypoxie de façon plus importante que le pic de vitesse de contraction.

1
2
2
3
4
5
6
A
B
Lmax/s
0
-max V
20
g/s/mm²
0
-dT/dt max/mm²
0.8
0
A.isot/A.isom
0.8
0
tRi

FIG.1

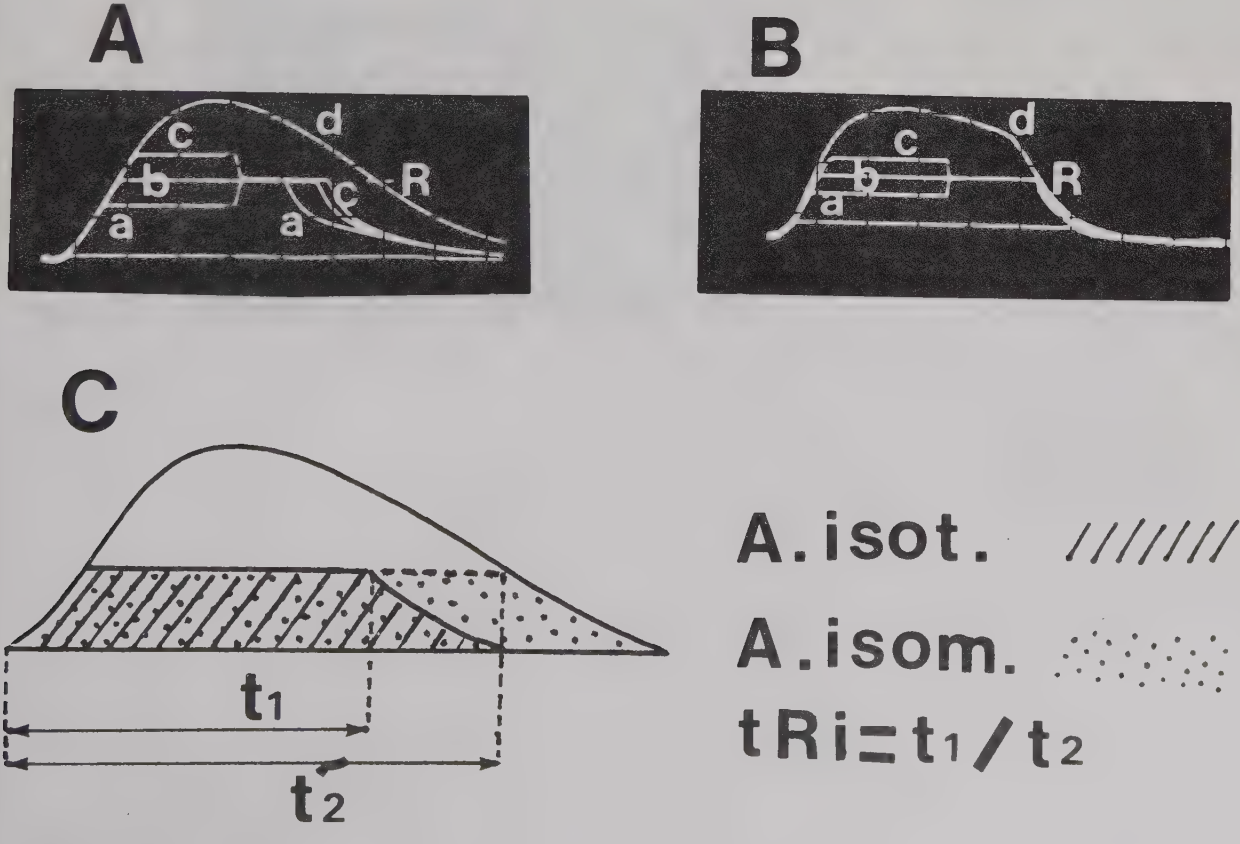

A
c
d
b
R
a
a
B
c
d
b
R
a
C
t1
t2
A.isot. ///////
A.isom.
tRi = t1/t2

FIG. 2

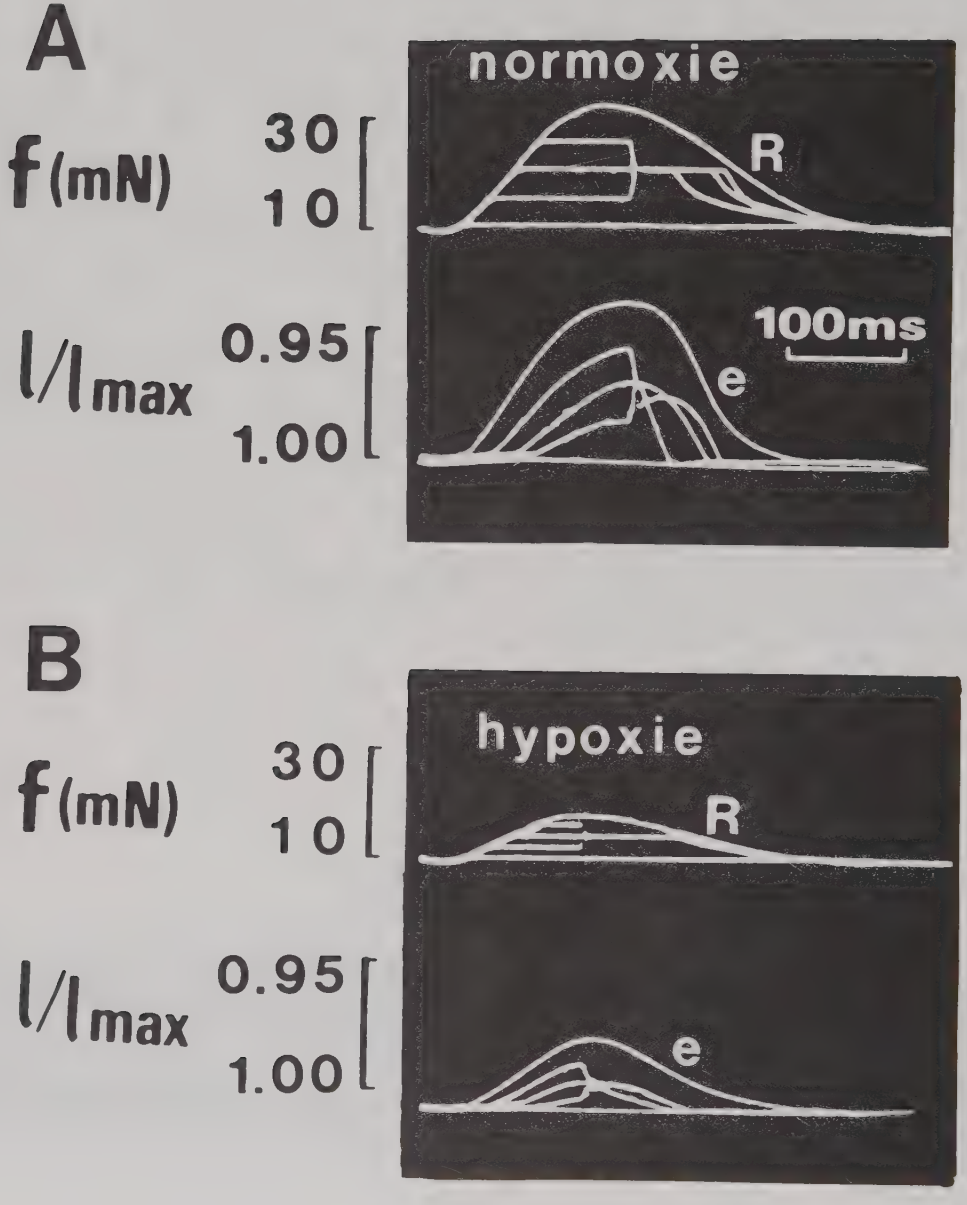

A
f(mN)
30
10
l/lmax
0.95
1.00
normoxie
R
100ms
e
B
f(mN)
30
10
l/lmax
0.95
1.00
hypoxie
R
e

FIG.3

Article sous presse dans CARDIOVASCULAR RESEARCH

# LOAD SENSITIVITY OF RELAXATION IN THE FOETAL AND NEWBORN RABBIT HEART

---

J. A. HOERTER, Y. LECARPENTIER*

ooOoo

INSERM U - 241
Laboratoire de Physiologie Cellulaire Cardiaque
91405 ORSAY FRANCE

* INSERM U-2, Hôpital Léon Bernard - 94450 LIMEIL BREVANNES,
and LOA-ENSTA, Ecole Polytechnique - 91120 PALAISEAU

---

Title : Relaxation of the perinatal rabbit heart

Key words : Mammalian heart, relaxation, foetus, newborn, frequency, development.

# S U M M A R Y

Differences in the mechanism of cardiac relaxation and the influence of changes in the stimulation frequency were studied in the foetal and newborn rabbit hearts. In the foetal rabbit heart wich lacks a well developed sarcoplasmic reticulum, load sensitivity of relaxation was investigated and compared to that observed in newborn. Load sensitivity was studied by measuring force and shortening length in twitches with increasing afterloads and also when load clamp steps were rapidly imposed during the twitch. Quantification of the load sensitivity was achieved by the measurement of the time to relaxation "tRi" which was linearly related to the relative developed force. The slope (S) of this linear relation quantifies the load sensitivity : the higher the slope, the more load sensitive the relaxation is. At a frequency of 24 beats/min, S was respectively 0.24 in the foetal heart and 0.36 in the newborn heart showing at both ages the existence of a load sensitivity and its significant increase at birth. No further increase of load sensitivity was observed from 1 day to 21 days after birth. Reducing the stimulation frequency from 24 to 10 beats/min abolished the load sensitivity in foetal hearts (S = 0.05) while, in the newborn, a significant load sensitivity could still be observed (S = 0.25). Thus, in rabbit myocardium, the load sensitivity of cardiac relaxation depended upon both the age and the stimulation frequency showing a perinatal development of the structures involved in the control of myocardial relaxation.

## INTRODUCTION

Relaxation is a complex phenomenon dependent upon the rate and extent of myoplasmic calcium decrease (either by the sarcoplasmic reticulum (SR) or by membrane extrusion), the affinity of troponin C for calcium and the dynamics of cross-bridges attachment and detachment. It has recently been shown for mammals in both the intact muscle and in isolated cells that relaxation is sensitive to loading conditions.[2] Load sensitivity disappears after either caffeine pretreatment.[3] or destruction of SR by the Brij 58 in isolated cardiac cells.[4] Moreover, load sensitivity has not been observed in the frog myocardium where SR is scarce and relaxation is mainly achieved by sarcolemmal extrusion of $Ca^{2+}$, via the Na-Ca exchange mechanism.[5] Such Na dependent-Ca extrusion is also involved in the relaxation of the foetal rabbit heart and progressively decreases after birth.[6] A poorly developed SR in the mammalian foetal heart and its progressive developement during the neonatal period have been shown both by morphological and functionnal evidence in various species.[7-12] Thus excitation-contraction coupling might differ in foetal, neonatal and adult mammalian hearts. Therefore, the purpose of this study was to compare the load sensitivity in foetal and newborn rabbit hearts.

## METHODS

Sixteen foetal and newborn rabbits ranging from 24 days post-coïtum, dpc, (term 31 dpc) to 21 days post-partum (dpp) were used for this study. Right ventricular strips were quickly removed and vertically mounted in an oxygenated bath at 21° C. Composition of the solution was in mM : NaCl 118 ; $NaHCO_3$ 25 ; KCl 4.7 ; $MgSO_4$ 1.2 ; $CaCl_2$ 2.5 ; glucose 7 ; mannitol 1.12 ; saturated with 95 % $O_2$ and 5 % $CO_2$ ; pH 7.35. Right ventricular strips were mounted between two clips, one fixed and the other connected to an electromagnetic lever system allowing simultaneous measurements of force and length as well as a feedback control of the load. The system was similar to that previously described.[13] A servo controlled current through the coil of an electromagnet determined the load applied to the ventricular strip . The equivalent moving mass of the system was 155 mg and the compliance 0.2 µm/mN. The displacement of the lever was measured by a photoelectric transducer consisting of a incandescent lamp, a miniature photodiode and a preamplifier. Muscle shortening while displacing the lever, modulated the light and altered the current of the photodiode. The system was linear up to 2.5 mm of muscle shortening. Records of force development and shortening length were displayed on a storage display unit (Tektronix 611) and was photographied with a hard-copy unit (Tektronix 4601). Field stimulation was applied by two parallel platinum electrodes (5 ms square pulses) at a voltage slightly above threshold and at a frequency of either 10 or 24 beats/min. After one hour of equilibration under stimulation, the ventricular strip was stretched to Lmax, initial resting length at which the experiments were carried out.

## RESULTS

Mechanical parameters of contraction and relaxation were studied during perinatal development of the rabbit at 24 and 10 beats/min. At 24 beats/min, maximum amplitude of shortening length (% Lmax) and maximum velocity of shortening length (max V) measured on the preloaded twitch were respectively (means ± SE) : 8.0 ± 0.5 % Lmax and 0.26 ± 0.01 Lmax/s in 24 to 28 days post-coïtum foetus (n = 22). These parameters significantly increased to 10.4 ± 0.9 % Lmax and 0.47 ± 0.01 in 14 to 21 days post partum newborns (n = 16 ; $p \leqslant 0.01$).

To study the relaxation phase in perinatal heart muscle, two types of experiments were performed. First, a series of twitches at Lmax were recorded with progressive increase of the afterload up to the isometric twitch. Second, load clamp steps were abruptly imposed at peak shortening of the isotonic twitch afterloaded at 50 % of the total isometric force. Depending upon the species, subsequent onset of the isometric relaxation occurred at different times, according to the loading conditions,[3] : such a protocol allow the differentiation between load sensitive and load insensitive relaxation. The load sensitivity of relaxation is characterized by a time course of relaxation which is strikingly affected either by the afterloaded level or by abrupt load clamps : the isometric phase of relaxation in afterloaded twitches occured earlier than relaxation of the isometric twitch. Representative records of superimposed afterloaded contractions (Fig. 1 A, C and E) and of contractions with abrupt load clamp steps (Fig. 1 B, D and F) are shown in foetal and newborn ventricular strips at two different stimulation frequencies. In both 28 dpc foetal and 1 dpp newborn hearts, load sensitivity of relaxation is shown in a series of afterloaded

twitches (Fig. 1A and E) and in twitches with abrupt load clamps (Fig. 1 B and F). However, the amplitude of the phenomenon was slightly more apparent in the 1 dpp newborn heart than in the 28 dpc foetal heart. The quantification of load sensitivity was achieved according to a method previously described.[1] The time to relaxation (tRi) is the ratio of the time to the initial tension decay at each isotonic afterload relative to the time at which the isometric twitch relaxes to the same afterload. "tRi" is a linear function of the relative afterloaded force normalized to the isometric force (see Fig. 2 A). The slope (S) of this straight line is used to quantify the degree of load sensitivity : the steeper the slope, the higher the load sensitivity of relaxation. On the contrary, in the frog heart, S tends to zero and relaxation is insensitive to loading conditions.[3] At various ages, ranging from foetus of 24 dpc to newborn of 21 dpp, modification of the load sensitivity is shown in the table. At a frequency of 24 beats/min, the slope S of the relation of "tRi" to the normalized force was always significantly different from zero ($p \leqslant 0.01$) for both foetal and newborn hearts. No significant differences were observed neither in foetus of 24 and of 28 dpc nor among newborns of 1, 9, 14 and 21 dpp. Thus slope values were pooled into two groups : foetus and newborn (Fig. 2 B - Table). Values of S were respectively 0.24 (linear regression coefficient $r = 0.83$) in foetal and 0.36 ($r = 0.96$) in newborn hearts. In adult ventricular strips, we measured a value of $S = 0.39$ ($r = 0.78$ ; $N = 7$), a value similar to that observed in the newborn. Thus, at a frequency of 24 beats/min, the load sensitivity of relaxation increased significantly at birth ($p < 0.05$) ; no further increase in load sensitivity was observed during neonatal development.

A decrease in the stimulation frequency from 24 to 10 beats/

and the maximum isometric force (Fig. 1 C). Peak of shortening length and max V dropped respectively to 4.1 ± 0.2 % Lmax and 0.10 ± 0.01 Lmax/s in 24 to 28 dpc foetus and 4.9 ± 0.4 % Lmax and 0.16 ± 0.01 Lmax/sec in 14 to 21 dpp newborns. Reduction of stimulation frequency to 10 beats/min also modified the load sensitivity of relaxation (Table). In the foetal heart (Fig. 1 C-D) relaxation became insensitive to loading conditions : different twitches with increasing afterloads or load clamped contractions did not induce a premature relaxation any longer. At this frequency of stimulation, S was 0.05 a value not significantly different from zero and similar to that observed in the frog ventricle. On the contrary in the newborn heart, relaxation remained load sensitive : the slope dropped from 0.36 at 24 beats/min to 0.25 at 10 beats/min (Table). In adult rabbit myocardium with a similar change in stimulation frequency, S decreased from 0.39 to 0.23. Thus varying the stimulation frequency revealed striking difference in the load sensitivity of foetal and newborn heart relaxation.

## DISCUSSION

The load sensitivity has been shown to imply an efficient sarcoplasmic reticulum which is able to modulate relaxation behaviour, according to the loading conditions.[14] In the adult mammalian heart load sensitivity is abolished by caffeine,[3] and hypoxia,[1] but is not altered by chronic cardiac hypertrophy.[13] Furthermore, load sensitivity is absent in species such as the frog where the SR is poorly developed. The present study emphasizes changes in load sensitivity of relaxation during ontogenesis in the foetal and newborn rabbit hearts. The effects of a modification in the stimulation frequency were also investigated . During both the last third of gestation and the neonatal period, load sensitivity of relaxation was evident at a stimulation frequency of 24 beats/min. Relaxation of the foetal heart was however significantly less load sensitive than that of the newborn heart (Table). At birth a maturation of the cardiac cells occurs : an increasing amount of SR vesicles appears during the neonatal period in the rat,[9] and the cat.[11] Moreover, in the rabbit heart between 4 days before birth and 20 days after birth, a morphometric study of the dyads (i.e functionnal coupling between SR and sarcolemma) has shown a sudden increase in their surface density at birth. Surface density of the dyads remained then stable from 1 to 20 days after birth.[10] In various species functionnal evidence for an increased activity of the SR was also observed in the neonatal period : increased $Ca^{2+}$ ATPase activity,[7] appearance of the $Ca^{2+}$-induced $Ca^{2+}$- release,[8] and physiological evidence of a functionnal SR.[6,11]. Load sensitivity of relaxation increased at birth, remained unchanged from 1 to 21 days after birth and was similar to that measured in the adult heart.

Our results are in good agreement with the development of the SR function in rabbit heart.

Varying the stimulation frequency revealed marked differences in the control of relaxation during the perinatal development. In newborn as well as in adult hearts, reduction of the stimulation frequency from 24 to 10 beats/min slightly reduced the degree of load sensitivity although the relaxation remained load sensitive. On the other hand, at 10 beats/min, load sensitivity was abolished in the foetal heart, thus revealing a "frog like" behaviour for the foetal relaxation. Decreasing the rate of stimulation is known to reduce the internal sodium and calcium activities.[15,16] These conditions decrease Ca uptake by the SR,[16] and alter the mechanical activity.[17,18] On the other hand, in foetal rabbit heart,[6] as in frog heart,[5] relaxation could be partially controlled by a sarcolemmal extrusion of Ca via Na-Ca exchange, providing an alternative mechanism of relaxation. This Na-Ca exchange role in relaxation decreases during perinatal growth as the role of the SR increases. The load sensitivity of relaxation which is normally not observed in the frog heart could be induced by alterations of the extracellular medium leading to an increased intracellular Ca activity.[3] On the other hand, variations of muscle length alters the free Ca concentration,[19] leading to the hypothesis that the affinity of troponin for Ca could be influenced by the developed tension. In conclusion load sensitivity of the foetal heart could be modulated by conditions modifying the excitation-contraction coupling. These observations reinforce the hypothesis that, in foetal heart, relaxation could be controlled by a variable balance involving at least two mechanisms : Ca uptake by the Sr and Ca extrusion by the sarcolemma.

The authors whish to thank Dr. G. VASSORT for helpfull discussions, and Mrs ANGELINI for secretarial assistance.

This work was supported in part by grant I.N.S.E.R.M. ATP n° 63.78.95 and CRL 82.50.45.

## L E G E N D S

Fig. 1 : Load sensitivity of foetal and newborn heart relaxation.

Effect of the stimulation frequency. In each pannel, force (upper trace) and shortening length (lower trace) are shown as a function of time. A-B : 28 days post-coïtum (dpc) foetus at 24 beats/min ; C-D : same foetal heart at 10 beats/min ; E-F : 1 day post partum (dpp) newborn heart at 24 beats/min.

In pannel A and E relaxation of isotonic twitches always occurs before relaxation of the isometric control beat : this characterizes the load sensitive relaxation commonly observed in mammalian hearts. In pannel C, no differences are seen in the time course of relaxation of various afterloaded contractions up to the isometric state : this characterizes the load insensitive relaxation. In pannels B, D and F, a loading step (twitch "b") and an unloading step (twitch c) of the same magnitude were imposed at the same time during contraction. Twitch "a" is the control afterloaded contraction at which the muscle was clamped. At 24 beats/min in both foetal and newborn ventricular strips (pannel B and F), load clamps induced striking differences in the time courses of relaxation (a, b, c). When the stimulation frequency was reduced to 10 beats/min in foetal heart, load clamps induce no difference in the subsequent time course of relaxation, (pannel D). This characterizes the load insensitive relaxation as observed in frog myocardium.

Fig. 2 : Quantification of the load sensitivity of relaxation in foetal and newborn hearts.

A : Method of quantification. Characteristic tension records of the isometric twitch and of an afterloaded twitch, in adult mammalian heart and in frog heart ; a = isotonic force developed by the

afterloaded twitch ; b = maximum isometric force ; a/b = relative force ; c = time when the isometric relaxation of the afterloaded twitch begins ; d = time at which the isometric twitch reaches the level a ; c/d = "tRi" = time to relaxation. The linear relation of the time to relaxation "tRi" as a function of the relative force a/b in mammalian and frog heart are schematically drawn on the right pannel : the slope S of this linear relation is positive in load sensitive relaxation (mammalian heart) and tends to zero in load insensitive relaxation (frog heart).

B : Linear regression of tRi as a function of the relative force a/b . Left pannel : at 24 beats/min, tRi = 0.24 a/b + 0.83 in foetus (dotted line) and tRi = 0.36 a/b + 0.72 in newborn (plain line). Foetal heart relaxation is significantly less sensitive to loading conditions than that of the newborn. Right pannel : reduction of the frequency to 10 beats/min abolishes the load sensitivity of foetal heart (tRi = 0.05 a/b + 0.99) while reducing it in the newborn heart (tRi = 0.25 a/b + 0.78). Foetus of ○ 24 dpc, △ 28 dpc, (in dotted line) and newborn of ● 1 dpp, ■ 9-10 dpp, ▲ 14-21 dpp (in plain line).

TABLE : Quantification of the load sensitivity in foetal and newborn rabbit ventricular strips.

This table gives the slope, S, and linear regression coefficient, r, of the time to relaxation as a function of the relative force respectively in foetal and newborn heart of various ages and at two stimulation frequencies (10 and 24 beats/min). N = number of measurements.

Analysis of variance showed no significant difference among slopes of 24 dpc and 28 dpc foetus : thus all foetus were pooled. Similarly

newborn hearts were pooled from 1 to 21 dpp.

+ : $p < 0.05$ ; ++ : $p < 0.01$ ; NS : not significantly different ;

* : not significantly different from a slope of zero.

# TABLE

| Age \ stimulation frequency | F = 24 BEATS/MIN | | | F = 10 BEATS/MIN | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | SLOPE | r | N | SLOPE | r |
| FOETUS | | | | | | |
| - 24 DPC | 13 | 0.24 NS | 0.964 | 7 | 0.06 NS | 0.957 |
| - 28 DPC | 9 | 0.23 | 0.969 | 9 | 0.02 | 0.613 |
| - FOETUS 24 to 28 dpc | 22 | 0.24+ | 0.945 | 16 | 0.05++ * | 0.718 |
| NEWBORN | | | | | | |
| - 1 DPP | 10 | 0.35 | 0.973 | 11 | 0.23 | 0.978 |
| - 9-10 DPP | 8 | 0.34 NS | 0.974 | 12 | 0.24 NS | 0.855 |
| - 14-21 DPP | 16 | 0.36 | 0.935 | 15 | 0.27 | 0.929 |
| - NEWBORN 1 to 21 dpp | 36 | 0.36 + | 0.959 | 39 | 0.25 ++ | 0.914 |

# R E F E R E N C E S

1 - CHUCK, L.H., GOETHALS, M.A., PARMLEY, W.W. and BRUTSAERT, D.L.
Load insensitive relaxation caused by hypoxia in mammalian cardiac muscle.
Circ. Res. 1981, 48 : 797-803.

2 - BRUTSAERT, D.L., DECLERCK, N.M., GOETHALS, M.A. and HOUSMANS, P.R.
Relaxation of ventricular cardiac muscle.
J. Physiol. (London) 1978 a, 283 : 469-480.

3 - LECARPENTIER, Y.C., CHUCK, L.H.S., HOUSMANS, P.R., DE CLERCK, N.M. and BRUTSAERT, D.L.
Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle.
Am. J. Physiol. 1979, 237 : H455-H460.

4 - BRUTSAERT, D.L., CLAES, V.A. and DE CLERCK, N. M.
Relaxation of mammalian single cardiac cells after pretreatment with the detergent Brij. 58.
J. Physiol. (London) 1978 b, 283 : 481-491.

5 - ROULET, M.J., MONGO, K.G., VASSORT, G. and VENTURA-CLAPIER, R.
The dependence of twitch relaxation on sodium ions and on internal $Ca^{++}$ stores in voltage clamped frog atrial fibres.
Pflügers Archiv. 1979, 379 : 259-268.

6 - HOERTER, J.A., MAZET, F. and VASSORT, G.
Perinatal growth of the rabbit cardiac cell : possible implications for the mechanism of relaxation.
J. Mol. Cell. Cardiol. 1981, 13 : 725-740

7 - NAYLER, W.G. and FASSOLD, E.
Calcium accumulation and ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum before and after birth.
Cardiovasc. Res. 1977, 11 : 231-237.

8 - FABIATO, A. and FABIATO, F.
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from foetal and newborn rat ventricles.
Ann. NY Acad. Science 1978, 507 : 491-522.

9 - OLIVETTI, G. ANVERSA, P. and LOUD, A.V.
Morphometric study of early postnatal development in the left and the right ventricular myocardium of the rat.
Circ. Res. 1980 ; 46 : 503-512.

10 - PAGE, E. and BUECKER, J. L.
Development of dyadic functional complexes between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma in rabbit ventricular myocardial cells.
Circ. Res. 1981, 48 : 519-522.

11 - MAYLIE, J.G.
Excitation-contraction coupling in neonatal and adult mammalian of cat.
Am. J. Physiol., 1982, 242 : H834-H843.

12 - MARTONOSI, A.
The development of sarcoplasmic reticulum membranes.
Ann. Rev. Physiol., 1982, 44 : 337-355.

13 - LECARPENTIER, Y.C., MARTIN, J.L., GASTINEAU, P. and HATT, P.Y.
Load dependence of mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy and heart failure.
Am. J. Physiol., 1982, 242 : H855-H861.

14 - BRUTSAERT, D.L., HOUSMANS, P.R. and GOETHALS, H.A.
Dual control of relaxation. Its role in the ventricular function in the mammalian heart failure.
Circ. Res., 1980, 47 : 637-652.

15 - LADO, M.G., SHEU, S.S. and FOZZARD, H.A.
Changes in intracellular $Ca^{2+}$ activity with stimulation in sheep cardiac Purkinje strands.
Am. J. Physiol., 1982, 243 : H133-H137.

16 - COHEN, C.J., FOZZARD, H.A. and SHEU, S.S.
Increased in intracellular sodium activity during stimulation in mammalian cardiac muscle.
Circ. Res. 1982, 50 : 651-662.

17 - ALLEN, D.G., JEWELL, B.R. and WOOD, E.H.
Studies of the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation.
J. Physiol. (London), 1976, 254 : 1-17.

18 - PARMLEY, W.W. and SONNENBLICK, E.H.
Relation between mechanics of contraction and relaxation in mammalian cardiac muscle.
Am. J. Physiol., 1969, 216 : 1084-1091.

19 - ALLEN, D.G. and KURIHARA, S.
The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle.
J. Physiol., 1982, 327 : 79-94.

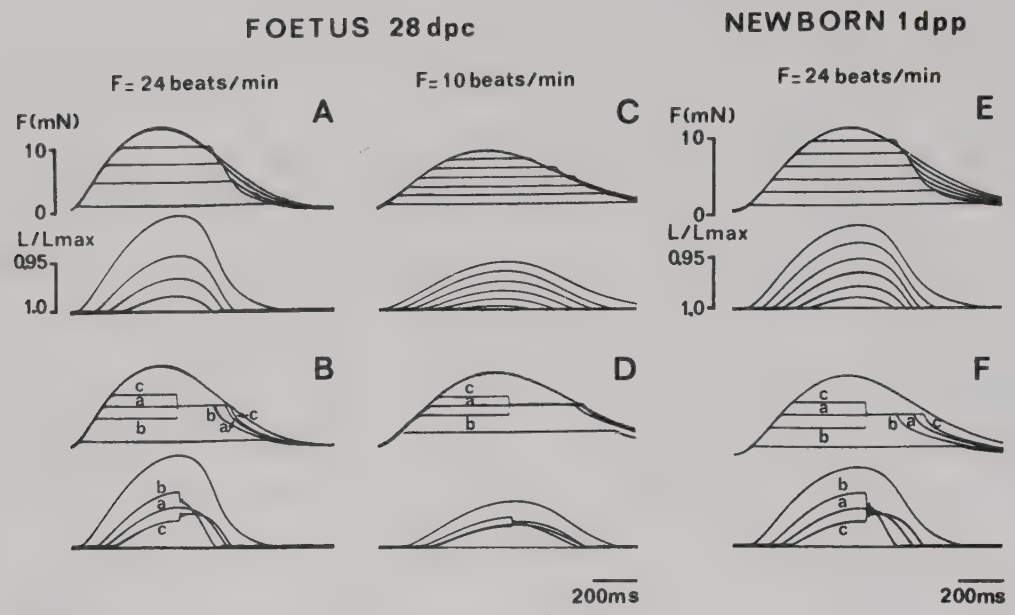

FOETUS 28 dpc
NEWBORN 1 dpp
F = 24 beats/min
F = 10 beats/min
F = 24 beats/min
F(mN)
10
0
L/Lmax
0.95
1.0
A
B
C
D
E
F
200ms
200ms

FIG.1

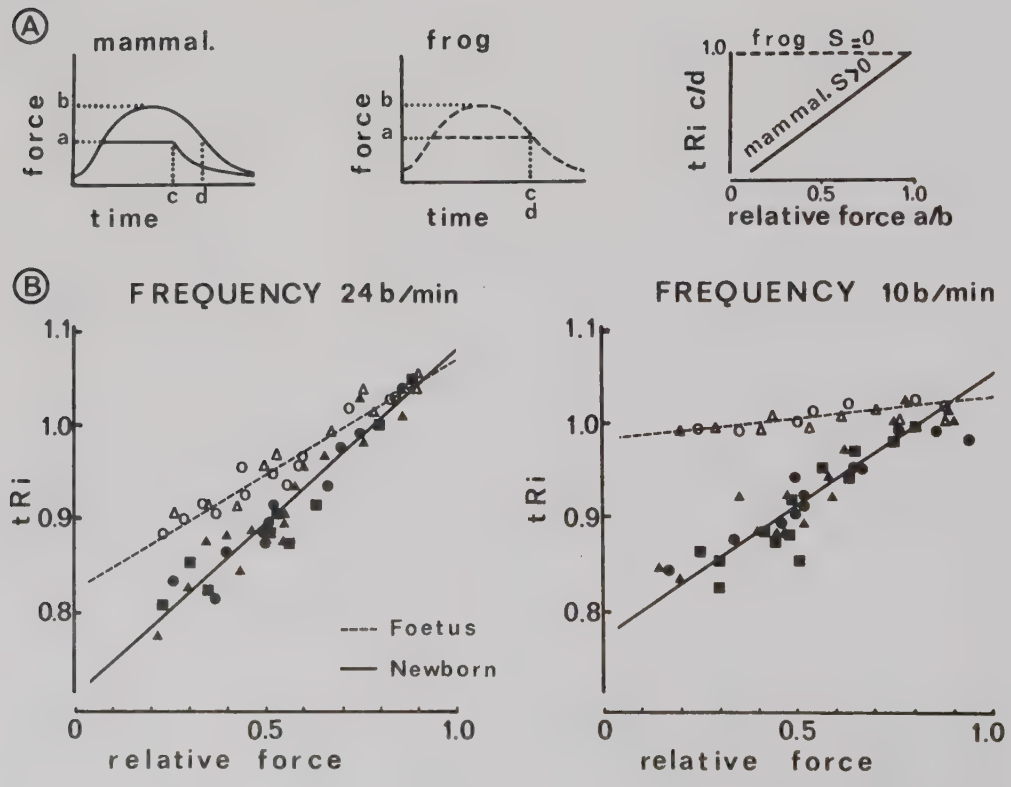

Ⓐ
mammal.
frog
force
time
c
d
tRi c/d
frog S=0
mammal. S>0
relative force a/b
Ⓑ
FREQUENCY 24 b/min
FREQUENCY 10 b/min
tRi
relative force
Foetus
Newborn

FIG.2

*Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (1981) 13, 1071–1075

RAPID COMMUNICATION

# Myosin Isoenzymic Distribution Correlates with Speed of Myocardial Contraction

(*Received* 8 *September* 1981, *accepted in revised form* 15 *September* 1981)

Because of the clinical implications, there has been an active search in recent years for a link in heart muscle between biochemical and mechanical parameters. Barany's observation [*2*] of a positive correlation in different types of skeletal muscles between intrinsic, actin-stimulated myosin adenosine-triphosphatase activity (ATPase) and muscle maximum speed of shortening ($V_{max}$) raised the question of a similar relation in cardiac tissue. The major problem in approaching this question in heart muscle was the technical difficulty in determining myosin ATPase activity in the structure best suited for mechanical studies *in vitro*, i.e. trabeculae or papillary muscles of small size. By assuming that the ventricular cavity was homogeneous, a relationship between ATPase activity and $V_{max}$ has been suggested by comparison of data obtained separately on different myocardial fragments for normal hearts of different animal species and in various states of myocardial impairment {for review see [*15*]}. Recent findings have shown that rat heart ventricles contain two major isoenzymes, $V_1$ and $V_3$, which exhibit very different ATPase activities, and whose ratio can change drastically in different physiological and pathological conditions [*4*, *6*, *8*, *9*, *10*, *13*]. Electrophoresis in non-dissociating conditions allows the determination of myosin isoenzymic distribution on minute amounts of tissue [*1*, *6*]. We demonstrate here, by comparing normal and various pathological states such as cardiac hypertrophy and hypophysectomy, that myosin isoenzymic composition and maximal speed of shortening of papillary muscle are linearly correlated. These results constitute direct evidence that cardiac contractility {defined as the time independent interrelationship between force, velocity and length [*3*]} is determined by myosin composition, independent of the etiology of myocardial impairment.

The experimental models selected for this study were those in which changes in contractility and myosin composition have been previously described: old control animals, cardiac hypertrophy induced by abdominal aortic constriction and hypophysectomized animals {for review, see [*10*, *15*]}. Sex and age-matched unoperated rats of the same strain, kept under identical housing conditions, were also used. Maximum unloaded shortening velocity of isolated papillary muscles was determined by the zero load clamp technique [*3*]. With this technique, $V_{max}$ is measured directly and this measured value expressed as $l_{max}/s$, characterizes the force–velocity–length relationship which is independent of time and initial length. Myosin isoenzymic composition was determined by electrophoresis of crude extracts of the papillary muscles under non-dissociating conditions employing pyrophosphate as a buffer to solubilize myosin [*1*, *6*]. Rat cardiac myosin is separated into three components, $V_1$, $V_2$ and $V_3$, which differ by their heavy chain composition {[*7*, *8*] Schwartz

0022–2828/81/121071+05 $02.00/0 © 1981 Academic Press Inc. (London) Limited

and Whalen, in preparation}. Hoh *et al.* [7] have shown that only two chemically distinct heavy chain subunits exist, α and β and that $V_1$ and $V_3$ are composed of αα and ββ homodimers respectively whilst $V_2$ is probably an heterodimer αβ.

Mechanical measurements and electrophoretic migration of myosin in the native state are shown in Figure 1(A) for a control heart and in Figure 1(B) for a hypertrophied heart. The curves labeled a correspond to only preloaded isotonic twitch contractions, while curves b were obtained by application of the zero load clamp technique [3]. Simultaneous records of tension and length as function of time are displayed in the upper and middle part of the figure respectively. They show that each twitch was performed at $l_{max}$, i.e. the initial length where active tension is maximal. Phase-plane analysis of the velocity–length relationship are represented in the lower part of Figure 1. Maximum shortening velocity (see arrows) was markedly reduced in the hypertrophied heart as compared to the control (3 and 1.4 $l_{max}$/s respectively). Myosin composition was also modified: in contrast to the control [Figure 1(A)] in which the $V_1$ form was predominant, $V_3$ was the major isoenzyme of the hypertrophied heart [Figure 1(B)]. This was in very good agreement with the decreases of extrapolated $V_{max}$ found by others on similar models [10] and with the isoenzymic shifts described previously [8]. Our data thus indicated that contractility is depressed when heart muscle contains predominantly myosin isoenzyme $V_3$.

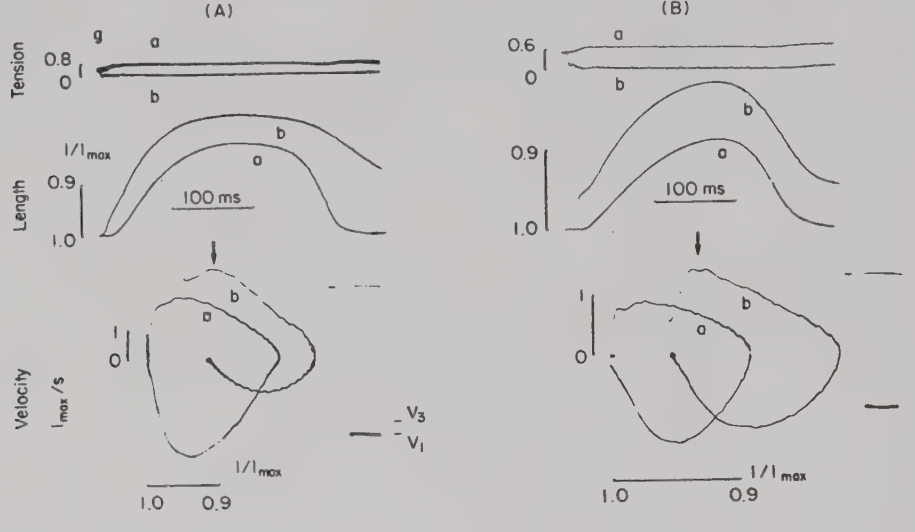



FIGURE 1. Force–velocity–length measurements and gel electrophoresis patterns of native myosins of isolated left ventricular papillary muscles. (A) Control animal; (B) hypertrophied heart obtained by abdominal aorta constriction. Papillary muscles were mounted within 2 min after removal in an oxygenated (95% $O_2$ and 5% $CO_2$) and thermostated (29°C) Krebs–Ringer solution, pH 7.4. They were electrically stimulated at a frequency of 6 beats/min by two platinum electrodes delivering rectangular pulses of 5 ms duration and about 10% above threshold. Maximal unloaded velocity was measured according to Brutsaert *et al.* [3]. Twitch a was preloaded at $l_{max}$ and twitch b was abruptly removed to zero load immediately after the latent period. Characteristics of the muscles: (A) weight 6.5 mg preload 0.8 g length at $l_{max}$ 4.7 mm, $V_{max}$ 3 $l_{max}$/s; (B) weight 10 mg, preload 0.6 g, length at $l_{max}$ 4 mm, $V_{max}$ 1.4 $l_{max}$/s. Electrophoretic examination of native myosins was performed essentially according to the protocol of Hoh *et al.* [6]. The gel and electrophoresis buffer solutions also contained 0.001 M EDTA, 0.02% (v/v) 2-mercaptoethanol [1]. Cylindrical polyacrylamide gels (60 mm × 5 mm) were prepared with 3.88% (w/v) acrylamide and 0.12% (w/v) *N*-*N*′ methylene bisacrylamide. Temperature of the electrophoresis buffer was maintained between +1 and +3°C and gels were run at a constant voltage of 14 V/cm for 22 h.

Figure 2 shows that maximal shortening velocity is linearly correlated either with the relative amount of $V_1$ (a) or inversely with that of $V_3$ (b). In presence of $Ca^{2+}$, or of actin and $Mg^{2+}$, $V_3$ exhibits a lower ATPase activity than $V_1$ [*6, 8, 11*]. It appears thus that cardiac contractility is linked to myosin composition and depends mainly on the rate of turnover of ATP at the level of the thick filament. It should be emphasized that hypertrophic and hypotrophic hearts were used in the present study, and that cardiac dysfunction resulted from stresses as different as chronic pressure overloads or thyroxine depletion induced by hypophysectomy. Our results do not of course, exclude the role of other biochemical mechanisms {for example myosin P-light chain phosphorylation in natural actomyosin preparations [*12*]} in the regulation of myocardial performance.

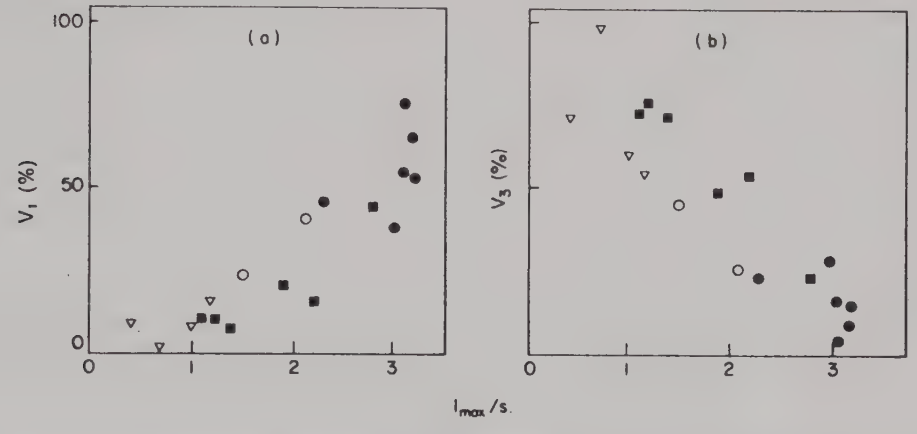



FIGURE 2. Relationship between the maximum velocity of shortening and the relative amount of myosin isoenzymes $V_1$ and $V_3$ in isolated papillary muscles from control and operated animals. Experimental conditions as in legend of Figure 1. The relative amount of each isoenzyme was calculated from the height of the peak obtained on a densitometric tracing of the corresponding gel (Gilford spectrophotometer model 240 equipped with a Hewlett-Packard 70-44A multirecorder tracing table). (●) 4- to 6-month-old controls; (○) 1- to 3-year-old controls; (■) cardiac hypertrophy induced by abdominal aortic constriction; rats were killed between 3 and 5 months after surgery and the percentage hypertrophy varied from 30 to 75%; (▽) rats hypophysectomized at 7 weeks of age and killed 5 weeks after the operation. Regression line were calculated using the method of least squares. (a) $y = 21.1x - 11.7$, $r = 0.89$, $P < 0.001$; (b) $y = -26.4x + 96$, $r = 0.91$, $P < 0.001$.

Cardiac myosin isoenzymic changes are not restricted to the situations presented here. In the rat, shifts occur also during ontogenic development [*6, 9*], physical training [*13*], in other models of mechanical overloads [*10, 13*] and in the diabetic heart [*4*]. In other animal species (mice, rabbits, beef, pigs), cardiac myosin is also composed of two major forms analogous to rat $V_1$ and rat $V_3$, whose relative amounts change during development [*9, 14*]. In rabbits, thyroid hormone induces structural changes in myosin [*5, 14*] which are most easily interpreted as the induction of a rabbit $V_1$ isoenzyme. Polymorphism of cardiac myosin seems thus to be a general feature of the mammalian heart, and the mechano-chemical relationship shown in the present study provides direct evidence for the role of myosin isoenzymic composition in the control of myocardial function, both in normal conditions and during heart disease.

*Acknowledgements*

We thank J. Bercovici and C. Wisnewsky for excellent assistance and M. Albaret for secretarial work. We also wish to thank R. G. Whalen for helpful discussions, and Professors P. Y. Hatt and A. Orszag for support and encouragement. This study was supported by grants from INSERM (80-50-34) and DGRST (78-7-2585) J. J. M. was the recipient of a fellowship from Roussel-Uclaf.

**K. Schwartz*, Y. Lecarpentier†, J. L. Martin†, A. M. Lompré*, J. J. Mercadier* and B. Swynghedauw***

**U127 INSERM, Hop. Lariboisière, 41 Boulevard de la Chapelle, Paris 75010, France*
*†U2 INSERM, Hop. Léon-Bernard, Limeil-Brevannes 94450 and LOA, ENSTA, Ecole Polytechnique, 91120 Palaiseau, France*

Key Words: Cardiac myosin isoenzymes; Papillary muscle; Maximum unloaded shortening velocity.

## REFERENCES

1. d'Albis, A., Pantaloni, C. & Bechet, J. J. An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *European Journal of Biochemistry* **99**, 261–272 (1979).
2. Barany, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *Journal of General Physiology* **50** (suppl.), 197–218 (1967).
3. Brutsaert, D. L. & Claes, V. A. Onset of mechanical activation of mammalian heart muscle in calcium and strontium-containing solutions. *Circulation Research* **35**, 345–357 (1974).
4. Dillmann, W. H. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes* **29**, 579–582 (1980).
5. Flink, I. L., Rader, J. H. & Morkin, E. Thyroid hormone stimulates synthesis of a cardiac myosin isozyme. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 3105–3110 (1979).
6. Hoh, J. F. Y., McGrath, P. A. & Hale, P. T. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **10**, 1053–1076 (1978).
7. Hoh, J. F. Y., Yeoh, G. P. S., Thomas, M. A. W. & Higginbottom, L. Structural differences in the heavy chains of rat ventricular myosin isoenzymes. *FEBS Letters* **97**, 330–334 (1979).
8. Lompré, A. M., Schwartz, K., d'Albis, A., Lacombe, G., Van Thiem, N. & Swynghedauw, B. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* **282**, 105–107 (1979).
9. Lompré, A. M., Mercadier, J. J., Wisnewsky, C., Bouvret, P., Pantaloni, C., d'Albis, A. & Schwartz, K. Species and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Developmental Biology* **84**, 286–290 (1981).
10. Mercadier, J. J., Lompré, A. M., Wisnewsky, C., Samuel, J. L., Bercovici, J., Swynghedauw, B. & Schwartz, K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circulation Research* **49**, 525–532 (1981).
11. Pope, B., Hoh, J. F. Y. & Weeds, A. The ATPase activity of rat cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Letters* **118**, 205–208 (1980).
12. Resink, T. J., Gevers, W., Noakes, T. D. & Opie, L. H. Increased cardiac myosin ATPase activity as a biochemical adaptation to running training: enhanced response to catecholamines and a role for myosin phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **13**, 679–694 (1981).

13. Rupp, H. The adaptive changes in the isoenzyme pattern of myosin from hypertrophied rat myocardium as a result of pressure overload and physical training. *Basic Research in Cardiology* **76**, 79–88 (1981).
14. Sartore, S., Gorza, L., Pierobon-Bormioli, S., Dalla Libera, L. & Schiaffino, S. Myosin types and fiber types in cardiac muscle. I. Ventricular myocardium. *Journal of Cell Biology* **88**, 226–233 (1981).
15. Scheuer, J. & Bahn, A. K. Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphatase activity and physiological function. *Circulation Research* **45**, 1–12 (1979).

# Mécanismes biochimiques de l'adaptation myocardique dans l'hypertrophie cardiaque*

par J.J. Mercadier**, Y. Lecarpentier***, C. Delcayre**, A.M. Lompre**, B. Swynghedauw** et K. Schwartz**

*Un mécanisme biochimique permettant au tissu cardiaque de s'adapter aux surcharges chroniques de travail a été récemment décrit chez le rat : un changement survient au niveau de la principale protéine contractile, la myosine car il y a synthèse d'une forme isoenzymique V3 à faible activité ATPasique. Dans le présent travail on se propose de déterminer : 1) si cette réponse est liée ou non à l'hypertrophie ; 2) quelles sont les conséquences de ce changement isoenzymique sur la contractilité cardiaque et enfin 3) si d'autres régulations existent, et plus particulièrement par l'intermédiaire de phosphorylations des sous-unités légères de la myosine.*

*Les modèles expérimentaux de surcharge de travail réalisés chez le rat ont été : sténose de l'aorte abdominale, insuffisance aortique, fistule aorto-cave, surcharge du tissu non nécrosé après ligature de l'artère coronaire gauche. Des fragments tissulaires provenant des parois ventriculaires droite et gauche et les muscles papillaires ont été prélevés. La composition isoenzymique de la myosine a été analysée par électrophorèse, la phosphorylation par l'étude de l'enzyme phosphorylant (MK), et la vitesse maximale de raccourcissement du muscle papillaire par la méthode du « zero-load clamp ». Les difficultés techniques rencontrées pour l'étude de la phosphorylation ne permettent pas encore de conclure à son rôle éventuel. Quand au schéma isoenzymique de la myosine, il a été confirmé que les animaux contrôles contiennent la forme V1 à haute activité ATPasique. Le pourcentage de la forme V3 augmente progressivement dans le ventricule gauche en fonction de l'âge jusqu'à atteindre 15 p. 100 (15 animaux étudiés). En ce qui concerne les surcharges, le pourcentage de V3 est statistiquement corrélé avec le degré d'hypertrophie dans les sténoses aortiques ($n = 11$, $r = 0,6$, $p < 0,05$) et les insuffisances aortiques ($n = 14$, $r = 0,88$, $p < 0,001$), mais pas dans les fistules aorto-caves ($n = 16$, $r = 0,46$). Il est également statistiquement corrélé dans le muscle papillaire, avec la vitesse maximale de raccourcissement ($n = 18$, $r = 0,91$, $p < 0,001$). Enfin la proportion de V3 est significativement plus élevée dans le muscle papillaire que dans la paroi ventriculaire gauche ($n = 20$, $r = 0,96$, $p < 0,001$).*

*L'ensemble de ces résultats suggère que hypertrophie et redistribution isoenzymique de myosine sont déclenchées simultanément dans les surcharges de pression, mais sont dissociées dans les surcharges de volume. Ils suggèrent très fortement par ailleurs que la contractilité intrinsèque de la fibre myocardique dépend du type de myosine présent.*

MOTS CLÉS : **hypertrophie cardiaque, cœur de rat, isoenzymes de la myosine, myosine kinase.**

(*) Etude présentée à la Journée Pierre Calazel de la Société française de cardiologie, novembre 1981.
Travail financé par des contrats INSERM (C.L. 80-50-34) et DGRST (78-7-2585).

(**) Unité 127 INSERM, hôpital Lariboisière, 41, bd de la Chapelle, 75010 Paris.
(***) Unité 2 INSERM, hôpital Léon-Bernard, 94450 Limeil-Brévannes, et LOA, ENSTA, Ecole Polytechnique, 91120 Palaiseau.

*Tirés à part :* Dr J.J. Mercadier, U 127 INSERM, hôpital Lariboisière, 41, bd de la Chapelle, 75010 Paris.

*Article reçu en janvier 1982.*

## INTRODUCTION

L'hypertrophie ventriculaire qui résulte d'une surcharge chronique de travail liée par exemple à une valvulopathie est généralement considérée comme un processus d'adaptation à de nouvelles conditions de fonctionnement. La mise en place de ce processus quantitatif d'adaptation sera rapportée par ailleurs [3]. Le changement isoenzymique de la myosine, décrit récemment dans ce laboratoire [9, 11, 13, 16, 17] peut être considéré lui aussi comme un mécanisme d'adaptation puisqu'il y a synthèse d'une forme de myosine V3 à activité ATPasique basse en remplacement de la forme normale V1 à activité élevée. Par analogie avec ce que l'on connaît de la physiologie des muscles squelettiques rapides et lents [14], on peut supposer que la présence de V3 permet au muscle cardiaque hypertrophié de travailler avec un meilleur rendement, le rendement étant considéré comme le nombre de moles d'ATP brûlées par gramme de travail fourni.

La présente étude a été entreprise pour déterminer s'il existe une corrélation entre le changement isoenzymique de la myosine et 1) l'augmentation de la masse myocardique, et 2) la contractilité intrinsèque de la fibre cardiaque. Par ailleurs, l'existence d'un mécanisme de régulation portant sur une modification de la phosphorylation d'une des sous-unités de la myosine a été recherchée.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a porté sur 65 rats opérés et sur 15 rats témoins.

Les sténoses aortiques (SA), les insuffisances aortiques (IA), les fistules aorto-caves (FAC), les infarctus expérimentaux (INF) ont été réalisés selon des méthodes décrites antérieurement [7, 13]. Quand une sténose aortique et une insuffisance aortique ont été associées, cette dernière a été réalisée 2 à 3 semaines après la sténose aortique. Les animaux ont été sacrifiés après des délais variables de surcharge allant de 3 à 28 semaines afin d'obtenir une gamme aussi large que possible d'hypertrophies, les méthodes utilisées pour produire la surcharge ne permettant pas de réaliser des hypertrophies très reproductibles. Les rats témoins ont été sacrifiés à des âges variant de 8 à 30 semaines afin que leur âge et leur poids correspondent approximativement à l'âge et au poids des rats opérés.

Les animaux ont été assommés. Leur cœur a été rapidement excisé, puis lavé, essuyé, pesé et congelé dans l'azote liquide (−170 °C) moins de deux minutes après le sacrifice. Le degré d'hypertrophie a été calculé en utilisant une droite de régression reliant le poids du cœur au poids du corps sur 152 animaux contrôles de notre animalerie [16]. Dans certains cas, le ventricule droit a été disséqué du ventricule gauche pour permettre une étude non seulement du ventricule gauche, mais également du ventricule droit.

Les extraits tissulaires et les électrophorèses en gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes ont été réalisés selon des méthodes décrites antérieurement [11]. La quantité relative de chaque isoenzyme a été calculée à partir des hauteurs respectives de chaque pic sur le tracé densitométrique. La mesure de l'activité de la myosine-kinase a été faite à partir de tissus broyés et extraits dans trois volumes d'un tampon de faible force ionique contenant notamment une forte concentration d'inhibiteurs des protéases. Le surnageant d'une centrifugation à 50 000 × g a été déposé sur une colonne de DEAE-Sephacel en présence d'EDTA 2 mM et d'inhibiteur des protéases. Après élution des protéines retenues par un gradient de KCl, les fractions contenant l'activité kinase sont identifiées et poolées. Cette fraction enrichie est incubée 2 à 10 min à 30 °C, en présence de chaînes légères de myosine squelettique, d'ATP-$\gamma$-$^{32}$P, de $Ca^{2+}$ et calmoduline. En fin d'incubation, l'activité est caractérisée par comptage en scintillation et électrophorèse, puis autoradiographie.

La vitesse maximale de raccourcissement du muscle papillaire isolé a été déterminée par la technique du « zero-load clamp » [5]. Par cette technique, Vmax qui caractérise la relation tridimensionnelle force-vitesse-longueur, indépendante du temps et de la longueur initiale est mesurée directement. A chaque surface correspond une Vmax donnée et un niveau de contractilité donné. Le schéma isoenzymique de la myosine des cœurs correspondants a été déterminé sur l'autre muscle papillaire et sur un fragment musculaire provenant de la paroi libre du ventricule gauche.

Abréviations : SA, sténose de l'aorte abdominale ; IA, insuffisance aortique ; FAC, fistule aorto-cave ; INF, infarctus ; MK myosine kinase ; Vmax, vitesse maximale de raccourcissement du muscle.

## RÉSULTATS

### A) HYPERTROPHIES EXPÉRIMENTALES

Les méthodes de surcharge de travail utilisées ont permis d'obtenir une large gamme d'hypertrophies (de 10 à 120 p. 100) pour les divers modèles étudiés. Le degré d'hypertrophie n'est pas fonction du temps, mais varie d'un animal à l'autre, probablement comme nous l'avons signalé plus haut, à cause du manque de reproductibilité des procédés chirurgicaux. Dans le groupe des infarctus, malgré l'important défaut musculaire réalisé par la nécrose, il y avait également une hypertrophie notable (jusqu'à 66 p. 100), ce qui sous-entend une hypertrophie réelle beaucoup plus importante du tissu non infarci. Il est à noter que, excepté pour quelques animaux dont le degré d'hypertrophie était supérieur à 100 p. 100, il n'y avait aucun signe patent d'insuffisance cardiaque (dyspnée, épanchement pleural, ascite, etc.).

### B) SCHÉMA ISOENZYMIQUE DE LA MYOSINE

#### 1. Paroi ventriculaire gauche

Le schéma des animaux témoins révèle avec une grande reproductibilité la prédominance chez le jeune adulte de la forme de migration rapide V1 (fig. 1). La quantité de V3 au niveau du ventricule gauche augmente avec le vieillissement aux dépens de la forme V1, et cette augmentation est significative (n = 15,

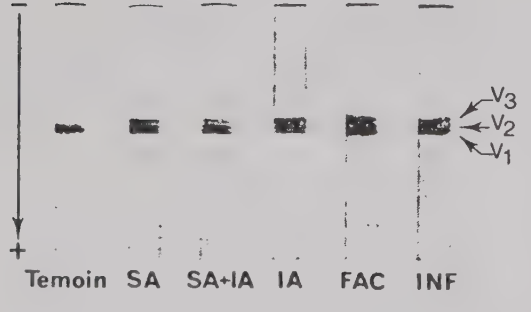



FIG. 1

Gels d'électrophorèse en condition non dissociante de myosines natives provenant du ventricule gauche d'un rat témoin et des divers types de surcharge mécanique chronique. SA : sténose de l'aorte ; SA + IA : sténose + insuffisance aortique ; IA : insuffisance aortique ; FAC : fistule aorto-cave ; INF : infarctus.

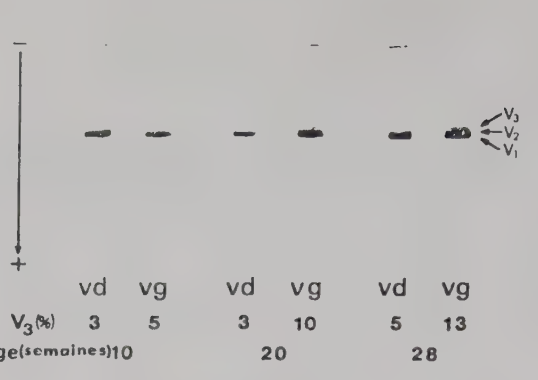



FIG. 2

Gels d'électrophorèse en condition non dissociante de myosines natives provenant de ventricules gauches (VG) et droits (VD) de rats témoins d'âges divers.

r = 0,73, $p < 0,01$). Toutes ces données sont en accord avec des observations précédemment publiées [8, 11].

Une redistribution isoenzymique en faveur de la forme V3 a été observée dans tous les modèles d'hypertrophie étudiés (fig. 1). Cette redistribution ne peut être attribuée à une contamination par les cellules non-musculaires puisqu'elle a été retrouvée à partir d'une préparation de myocytes isolés [13]. Le pourcentage de la forme V3 est corrélé significativement avec le degré d'hypertrophie pour l'ensemble des rats étudiés moins les INF (n = 55, r = 0,7, $p < 0,001$). Cependant en étudiant la corrélation pour chaque groupe on constate que celle-ci reste vérifiée pour les IA (n = 14, r = 0,88, $p < 0,001$), les SA (n = 11, r = 0,61 $p < 0,05$) les SA+IA (n = 14, r = 0,69, $p < 0,01$) mais pas pour le groupe des FAC (n = 16, r = 0,46).

#### 2. Comparaison parois ventriculaires gauche et droite

On ne retrouve pas au niveau du ventricule droit de corrélation significative entre l'âge de l'animal et la proportion de la forme V3 (fig. 2) ; la quantité de la forme V3 semble n'augmenter que très lentement dans ce ventricule ce qui fait que la différence V3 VG −V3 VD augmente progressivement en fonction de l'âge.

Dans les surcharges du ventricule gauche (SA et IA) et dans le groupe des infarctus expérimentaux eux aussi intéressant le ventricule gauche, le changement isoenzymique est toujours plus important au niveau de ce ventricule [11]. Au contraire, dans le groupe des

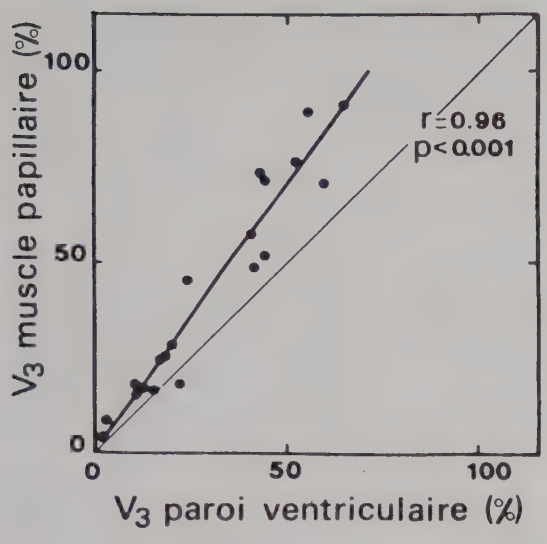



FIG. 3

Relation entre les pourcentages de l'isoenzyme V3 de la myosine dans la paroi libre du ventricule gauche et dans un muscle papillaire du même ventricule de cœurs de rats témoins ou ayant subi une sténose de l'aorte abdominale.

fistules aorto-caves, ventricule droit et ventricule gauche sont transformés dans la même proportion, le rapport V3 VG/V3 VD étant de 2/1, c'est-à-dire à peu près identique à celui du groupe des animaux témoins.

**3. Comparaison muscle papillaire et paroi ventriculaire**

Comme le montre la figure 3, il existe une corrélation statistiquement significative entre les schémas isoenzymiques du muscle papillaire et de la paroi ventriculaire correspondante. Cependant la pente de la droite de régression est significativement différente de la droite d'identité ($p < 0{,}001$). Ainsi dans un même cœur le pourcentage de la forme V3 est statistiquement plus élevé dans le muscle papillaire que dans la paroi ventriculaire.

### C) RELATION ENTRE LE SCHÉMA ISOENZYMIQUE DE LA MYOSINE ET LA VITESSE DE RACCOURCISSEMENT DU MUSCLE

Pour obtenir la gamme de valeurs la plus étendue possible, des muscles papillaires d'animaux hypophysectomisés ont été adjoints aux autres groupes expérimentaux. En effet, l'hypophysectomie induit, par le biais de l'hypothyroïdie qu'elle entraîne, la synthèse de V3, et il est facile avec ce modèle, d'obtenir des animaux dont la myosine est formée presque exclusivement de cette forme [8].

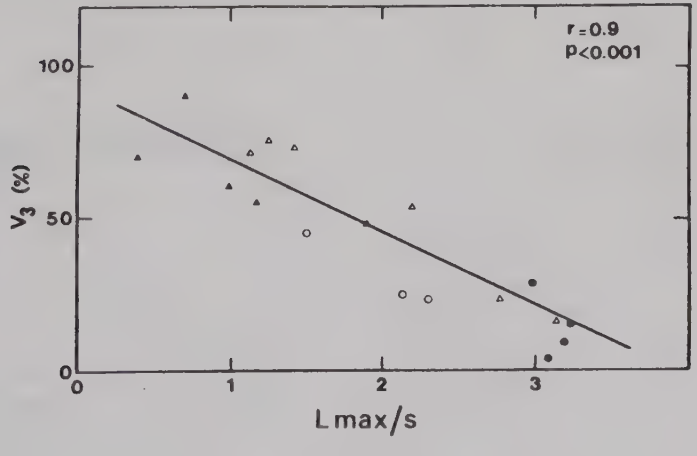



FIG. 4

Relation entre la vitesse maximale de raccourcissement et le pourcentage de l'isoenzyme V3 d'un même muscle papillaire provenant du ventricule gauche de divers groupes d'animaux : ( ● ) rats témoins de 4 à 6 mois ; ( ○ ) rats témoins de 1 à 3 ans ; (△ ) rats ayant subi une sténose de l'aorte (de 30 p. 100 à 75 p. 100 d'hypertrophie) ; ( ▲ ) rats hypophysectomisés.

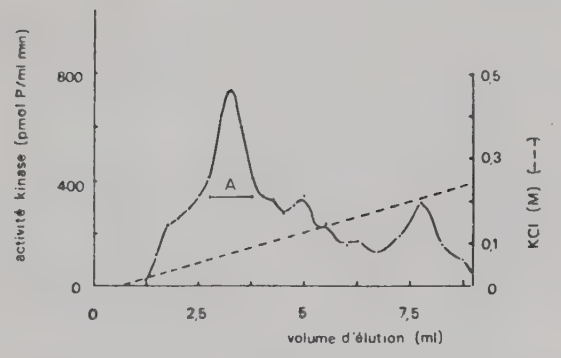



FIG. 5

Profil d'activité myosine kinase après chromatographie d'un extrait de cœur de rat sur DEAE-Sephacel en gradient de KCl. L'activité est mesurée par incorporation de $^{32}P$ dans la chaîne légère 20 K de myosine, en présence de $Ca^{2+}$ 0,1 mM et calmoduline $10^{-6}$ M.

L'étude de la vitesse maximale de raccourcissement du muscle papillaire isolé révèle de grandes variations entre les différents groupes. Une nette diminution de la Vmax est trouvée pour les SA et les vieux rats (de 2,8 à 1,2 Lmax/s en moyenne). Les muscles papillaires de rats hypophysectomisés voient leur Vmax encore plus abaissée. Il existe une corrélation négative très significative entre le taux de l'isoenzyme V3 et la vitesse maximale de raccourcissement du muscle papillaire ($r = 0,91$, $p < 0,001$) (fig. 4). Inversement la corrélation positive entre le taux de la forme V1 et la vitesse maximale de raccourcissement est également hautement significative ($r = 0,89$, $p < 0,001$).

### D) PHOSPHORYLATION DES SOUS-UNITÉS LÉGÈRES DE LA MYOSINE

La figure 5 montre le profil d'élution de l'activité myosine kinase du cœur de rat sur DEAE-Sephacel. La fraction sélectionnée pour le dosage est éluée entre 50 et 100 mM KCl. Cette fraction enrichie en myosine kinase contient d'autres kinases, et l'autoradiographie permet l'identification des substrats. Les incubations sont effectuées en présence, puis absence de chaînes légères de myosine, et l'activité myosine kinase est calculée par la différence de ces deux valeurs. Cette incorporation différentielle est trouvée en totalité au niveau de la chaîne légère phosphorylable de la myosine. On observe (fig. 6, a à d) que l'activité myosine kinase du cœur de rat est peu dépendante de la présence de $Ca^{2+}$ ou de calmoduline, malgré la présence d'inhibiteurs des protéases.

## DISCUSSION

Les résultats rapportés ici montrent que le changement isoenzymique de la myosine avec production d'une forme V3 à faible activité ATPasique est une réponse générale du cœur de rat adulte à une surcharge de travail (fig. 1), mais que cette réponse n'est pas nécessairement liée à l'hypertrophie. De plus la relation observée entre la proportion de V3 et la vitesse maximale de raccourcissement (fig. 3) suggère très fortement que la contractilité intrinsèque de la fibre myocardique est sous la dépendance du type de myosine présent. Ces données fournissent une base moléculaire aux diminutions d'activité ATPasique et d'activité contractile rapportées antérieurement dans la littérature [15]. La nature de l'isoenzyme V3 reste encore à préciser. Les premiers résultats indiquent cependant que ce serait la même forme que la forme V3 présente chez ce fœtus [12]. Il y aurait donc réapparition chez l'adulte de la forme fœtale. Quant à l'autre mécanisme éventuel de régulation de l'activité ATPasique de la myosine étudié ici, i.e. la phosphorylation de la chaîne légère, il est clair que des difficultés d'ordre technologique sont à surmonter avant de pouvoir conclure à son rôle éventuel.

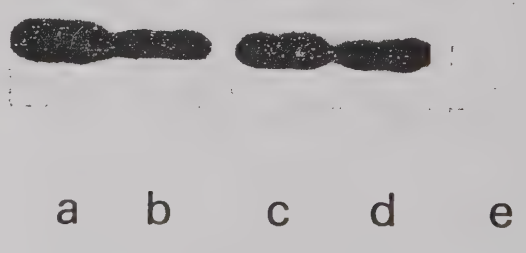



FIG. 6

Autoradiogramme montrant l'incorporation de $^{32}P$ dans la chaîne légère 20 K de myosine après séparation sur électrophorèse dénaturante. Les incubations sont réalisées sur le pic A élué de la colonne de DEAE-Sephacel (fig. 5) en présence de : (a) chaines légères totales de myosine 0,4 mM, $Ca^{2+}$ 0,1 mM, calmoduline $10^{-6}$ M ; (b) comme (a), sans $Ca^{2+}$ ; (c) chaîne légère 20 K de myosine 0,2 mM, $Ca^{2+}$ 0,1 mM, calmoduline $10^{-6}$ M ; (d) comme (c), sans calmoduline ; (e) $Ca^{2+}$ 0,1 mM, calmoduline $10^{-6}$ M.

En effet l'absence de dépendance vis-à-vis du $Ca^{2+}$ et de la calmoduline (fig. 6) est une différence importante par rapport à ce que l'on connaît des kinases du muscle squelettique ou du cœur d'autres espèces animales [4, 19]. On peut supposer que cette différence est due à une activité protéolytique importante du cœur de rat, et aucune conclusion nette ne peut être obtenue dans ces conditions.

La corrélation qui existe entre le degré d'hypertrophie et l'importance de la redistribution isoenzymique dans les sténoses et les insuffisances aortiques révèle que dans ces modèles de surcharge chronique réalisant une augmentation de la pression ou tout au moins de la contrainte pariétale du ventricule gauche, l'augmentation de synthèse protéique, responsable de l'hypertrophie, est accompagnée par la synthèse parallèle d'une nouvelle forme de myosine V3. De même l'augmentation observée au cours du vieillissement peut être considérée comme la résultante d'une surcharge de pression due à une augmentation de l'impédance aortique [20]. Cependant les deux facteurs adaptatifs ne sont pas utilisés de façon identique ou simultanée par le cœur dans une surcharge dite de volume. En effet dans les fistules aorto-caves, une complète inversion isoenzymique n'a jamais été observée. De plus certains cœurs très notablement hypertrophiés avaient même un schéma isoenzymique à peine différent de celui des témoins. Ces résultats sont à rapprocher de ceux d'autres équipes qui n'ont observé que peu ou pas de modifications soit des activités ATPasiques de la myosine soit de la fonction contractile dans divers autres modèles de surcharges de volume (rev. dans [11]). Il peut paraître étonnant de constater que, en ce qui concerne le schéma isoenzymique de la myosine, l'insuffisance aortique, considérée habituellement comme une surcharge de volume, s'apparente beaucoup plus aux sténoses qu'aux fistules aorto-caves. On peut postuler pour expliquer cette observation que, dans ses effets, l'insuffisance aortique se rapproche d'une surcharge de pression puisque la contrainte systolique y est, avant l'installation de l'hypertrophie compensatrice, extrêmement élevée, à des niveaux comparables à ceux des sténoses. En revanche, la contrainte systolique dans une fistule aorto-cave est mal connue, et doit vraisemblablement être très dépendante de la taille de la fistule, de l'augmentation du débit à travers l'orifice aortique, etc. Le seul moyen de répondre à ces questions serait de mesurer les contraintes pendant la phase de contraction isovolumétrique et pendant la phase éjectionnelle aux différents stades de l'installation de l'hypertrophie dans les divers modèles, ce qui pose encore problème en expérimentation chez le petit animal.

On ne peut émettre que des hypothèses en ce qui concerne le ou les facteurs déclenchant les changements isoenzymiques. Il est bien connu qu'une augmentation de la contrainte systolique réduit la vitesse instantanée de raccourcissement et que d'autre part, le rendement optimal d'un muscle en termes de grammes de travail fourni par mole d'ATP consommée est obtenu pour une vitesse de raccourcissement donnée [14]. L'augmentation de la contrainte systolique diminue ainsi le rendement en diminuant la vitesse instantanée de raccourcissement. Cette diminution de rendement pourrait constituer le facteur déclenchant le changement permanent de la vitesse maximale de raccourcissement réalisé par la redistribution isoenzymique de la myosine. Ce concept d'amélioration du rendement vient récemment d'être confirmé par des études effectuées sur des muscles papillaires de lapin qui montrent que le muscle hypertrophié produit moins de chaleur que le muscle normal pour le développement d'une tension équivalente [2].

La relation décrite ici entre les schémas isoenzymiques des muscles papillaires et de la paroi libre du ventricule montre (fig. 4) l'inhomogénéité de la cavité cardiaque en terme de composition isoenzymique. Ceci est à rapprocher d'observations récentes d'autres auteurs qui ont rapporté des différences isoenzymiques entre zones subendocardiques et subépicardiques [6]. Ces variations sont sans doute liées aux différences de contrainte systolique qui existent d'une région à l'autre de la paroi du ventricule gauche aussi bien qu'entre couches sous-endo et sous-épicardiques [8].

Le problème bien sûr maintenant est d'établir si ce mécanisme d'adaptation peut aussi être mis en jeu chez l'homme. Les premiers résultats ne montrent de façon claire ni un changement isoenzymique, ni une baisse de l'activité ATPasique de la myosine. Cependant des baisses de l'activité ATPasique de l'ensemble des myofibrilles ont été rapportées [1, 10]. On peut donc supposer soit l'existence d'autres isoenzymes non encore détectés soit

d'autres mécanismes de régulation impliquant d'autres protéines myofibrillaires. Ceci reste maintenant à déterminer.

*Nous remercions Mme Bercovici et Mlle Wisnewsky pour l'aide efficace à la réalisation des sténoses aortiques et des électrophorèses et Mme de Villedon pour le travail de secrétariat.*

## Bibliographie

1. Alpert N.R., Gordon M.S. Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestive heart failure. *Am. J. Physiol.*, **202**, 940, 1962.
2. Alpert N.R., Mulieri L.A. Heat, mechanics and myosin ATP ase in normal and hypertrophied heart muscle. *Federation Proc.*, **41**, 192, 1982.
3. Aumont M.C., Moalic J.M., Ray A., Bercovici J., Swynghedauw B. : Synthèse protéique et synthèse d'ARN ribosomal au cours de l'hypertrophie cardiaque expérimentale. En préparation.
4. Blumenthal D.K., Stull J.T. : Activation of skeletal myosin light chain kinase by calcium and calmodulin. *Biochemistry*, **19**, 5608, 1980.
5. Brutsaert D.L., Claes V.A. : Onset of mechanical activation of mammalian heart muscle in calcium and strontium-containing solutions. *Circ. Res.*, **35**, 345, 1974.
6. Gorza L., Pauletto P., Pessina A.C., Sartore S., Schiaffino S. : Isomyosin distribution in normal and pressure-overloaded rat ventricular myocardium. *Circ. Res.*, **49**, 1003, 1981.
7. Hatt P.Y., Rakusan K., Gastineau P., Laplace M. : Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-caval fistula in the rat). *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **11**, 989, 1979.
8. Hoh J.F.Y., Mc Grath P.A., Hale P.T. : Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin : effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **10**, 1053, 1978.
9. Klotz C., Swynghedauw B., Mendes H., Marotte F., Leger J.J. : Evidence for new forms of cardiac myosin heavy chains in mechanical overloading and in aging. *Eur. J. Biochem.*, **115**, 415, 1981.
10. Leclercq J.F., Swynghedauw B. : Myofibrillar ATPase, DNA and hydroxyproline content of human hypertrophied heart. *Eur. J. Clin. Invest.*, **6**, 27, 1976.
11. Lompre A.M., Schwartz K., d'Albis A., Lacombe G., Thiem N.V., Swynghedauw B. : Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature*, **282**, 105, 1979.
12. Lompre A.M., Mercadier J.J., Wisnewsky C., Bouveret P., Pantaloni C., d'Albis A., Schwartz K. : Species and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Develop. Biol.*, **84**, 286, 1981.
13. Mercadier J.J., Lompre A.M., Wisnewsky C., Samuel J.L., Bercovici J., Swynghedauw B., Schwartz K. : Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, **49**, 525, 1981.
14. Nwoye L.O., Goldspink G. : Biochemical efficiency and intrinsic shortening speed in selected vertebrate fast and slow muscles. *Experientia*, **37**, 856 (1981).
15. Scheuer J., Bahn A.K. : Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphatase activity and physiological function. *Circ. Res.*, **45**, 1, 1979.
16. Schwartz K., Bouveret P., Bercovici J., Swynghedauw B. : An immunochemical difference between myosins from normal and hypertrophied rat hearts. *FEBS Letters*, **93**, 137, 1978.
17. Schwartz K., Mercadier J.J., Lompre A.M., d'Albis A., Lacombe G., Thiem N.V., Samuel J.L., Swynghedauw B. : Un nouveau mécanisme d'adaptation aux surcharges mécaniques chroniques, le changement isozymique de la myosine. *Arch. Mal. Cœur*, **73**, 599, 1980.
18. Stein P.D., Marzilli M., Sabbah H.N., Lee T. : Systolic and diastolic pressure gradient within the left ventricular wall. *Am. J. Physiol.*, **238**, 625, 1980.
19. Walsh M.P., Vallet B., Autric F., Demaille J.G. : Purification and characterization of bovine cardiac calmodulin-dependent myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12136, 1979.
20. Yin F.C.P., Spurgeon H.A., Weisfeldt M.L., Lakatta E.G. : Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. A comparison between hypertrophy induced by senescence and by aortic banding. *Circ. Res.*, **46**, 292, 1980.

| | |
|---|---|
| TITRE | BIOCHEMICAL MECHANISMS OF MYOCARDIAL ADAPTATION IN CARDIAC HYPERTROPHY. |
| AUTEUR(S) | J.J. Mercadier, Y. Lecarpentier, C. Delcayre, A.M. Lompre, B. Swynghedauw and K. Schwartz. |
| RÉFÉRENCE | Vol. 75, n° 10, p. 1179, 1982. |

The biochemical mechanisms of myocardial adaptation to chronic overload has recently been described in the rat ; a change occurs in the principal contractile protein, the myosin, with synthetis of a V3 isoenzymatic form with low ATP-ase activity. This study was undertaken to determine : 1) whether or not this response is related to the hypertrophy ; 2) what are the consequences of this change on cardiac contractility and 3) if other changes occur, and in particular through the intermediary of phosphorylation of the light sub-units of myosin.

The experimental models of overload used in the rat were : stenosis of the abdominal aorta, aortic insufficiency, aorto-caval fistula, overload of non-necrosed tissue after ligation of the left coronary artery. Biopsies of right and left ventricular walls and papillary muscles were taken. The isoenzyme composition of the myosin was analysed by electrophoresis, phosphorylation by the study of the phosphorylating enzyme (MK) and the maximal velocity of papillary muscle shortening by the zero load clamp method. Technical difficulties in the study of the phosphorylation process prevented any conclusions being drawn as to its possible role. The study of the isoenzymatic forms of myosin confirmed that control animals had the VI form with high ATP-ase activity. The percentage of V3 in the left ventricle increased progressively with age to a value of 15 % (15 animals studied). In the overload groups, the percentage of V3 was statistically related to the degree of hypertrophy in aortic stensis ($n = 11$, $r = 0,60$, $p < 0,05$) and aortic insufficiency ($n = 14$, $r = 0,88$, $p < 0,001$) but not in aorto-caval fistula ($n = 16$, $r = 0,46$). A statistically significant correlation with the maximal velocity of shortening was also found in papillary muscle ($n = 18$, $r = 0,91$, $p < 0,001$). The proportion of V3 was significantly higher in the papillary muscle than in the left ventricular wall ($n = 20$, $r = 0,96$, $p < 0,001$).

These results suggest that hypertrophy and the isoenzymatic redistribution of myosin occur simultaneously in pressure overload but are dissociated in volume overload. They also strongly suggest that the intrinsic contractility of the myocardial fibre is determined by the type of myosin present.

*European Heart Journal* (1982) 3 (*Supplement* A), 75–82


# Isoenzymic changes in myosin and hypertrophy; adaptation during chronic mechanical overload*

B. Swynghedauw, C. Delcayre, J.-M. Moalic, Y. Lecarpentier, A. Ray, J.-J. Mercadier, A.-M. Lompre, M.-C. Aumont and K. Schwartz

*Unité 127 INSERM, Hôpital Lariboisière, 41 Boulevard de la Chapelle, 75010 Paris, France*

KEY WORDS: Cardiac hypertrophy, myosin ATPase isoenzymes, protein synthesis, ribosomal RNA.

*Hypertrophy and a decrease in maximal contractile rate characterize the cardiac response to chronic mechanical overload. Both protect the myocardium, the first by increasing the number of contractile units, the second by maintaining the normal energy balance.*

*Decrease in the contractile rate is correlated with (and is probably a function of) the decrease in myosin ATPase. This is due to an isoenzymic change, which has been demonstrated in the rat but remains hypothetical in man, towards a fetal form with a low ATPase activity. This redistribution, correlated with the degree of hypertrophy, is seen after stenosis or aortic insufficiency, infarction, a genetic tendency to hypertension and, after a longer latency, aorto-caval fistulae. The maximal contractile rate, measured for papillary muscle using the 'zero-load clamp' technique, is correlated with this isoenzymic change.*

*Mechanisms associated with the onset of hypertrophy have been studied by continuous infusion of tyrosine $C^{14}$ or lysine $H^3$ as a protein synthesis precursor, and uridine $H^3$ as an RNA precursor. While the rate of protein synthesis doubled after both aortic stenosis and aortic insufficiency, in the former case this doubling was seen after four days, while in the latter, it occurred only after 15 days.*

*Myosin synthesis is normally twice as rapid as actin synthesis, and despite the increase in both, this proportion remained constant after four days of stenosis. The rise in protein synthesis preceded the increase in synthesis of ribosomal RNA 28 S fraction; thus the cardiac ribosomal stock is sufficiently large to allow an increase in protein synthesis in the absence of* de novo *ribosomal synthesis.*

A mechanical overload can frequently be tolerated over a long period due to adaptation of the heart, the circulatory system and the blood itself. Two adaptive myocardial changes, hypertrophy due to stimulation of protein and RNA synthesis, and decrease in the maximal contractile rate due to an isoenzymic change in myosin are implicated, at least in certain species.

Hypertrophy is beneficial to cardiac muscular function since it increases the number of contractile units and the decrease in contractile rate allows for a normal pressure to be developed with a higher degree of efficiency[1]. For this reason, the term 'pathological hypertrophy' is misleading since hypertrophy only becomes detrimental to cardiac pump function as a result of changes in cardiac configuration. A slowing of the contractile rate is beneficial for the muscle fiber but the resultant change in pumping efficiency must be compensated for. Therefore, cardiac failure is not a specific pathological entity but represents the limit of adaptive phenomena.

The study of mechanical overload during the stage of compensated hypertrophy to determine the limits of physiological adaptive phenomena should help the development of new therapeutic and diagnostic techniques.

*This work has been supported by an open INSERM contract.

0195-668X/82/03A075 + 08 $02.00/0

© 1982 The European Society of Cardiology

The study of structural changes and of both qualitative (myosin isoenzymic redistribution) and quantitative (protein and RNA synthesis) biochemical changes help in understanding of the development of hypertrophy and its physiological significance.

### Structural changes

Myocardial morphology is modified very little during the phase of compensated hypertrophy, although there are numerous biochemical and structural changes during this period which may be considered as adaptations to preserve cellular function. Of these changes, the decrease in maximal contractile rate has the greatest effect upon cardiac function and this correlates the decrease in myosin ATPase activity (reviewed in Swynghedauw *et al.*[2]). Myosin ATPase activity shows an almost linear correlation with the maximal contractile rate, both for skeletal and for cardiac muscles of different species[3, 4]. For skeletal muscle, the differences in enzyme activity between various animal species has been shown to be attributable to minor changes in myosin structure, the differences between various muscles in a given species being a function of isoenzymic variability (reviewed in Swynghedauw *et al.*[2]).

Similar isoenzymatic variability has recently been demonstrated in the normal heart[5, 6]. This demonstration has required the use of new techniques since, unlike skeletal muscle, cardiac isoenzymes are not identifiable by ordinary electrophoresis. Isoenzymic myosin redistribution in chronic mechanical overload was first demonstrated in our laboratory in 1979[7]. In this paper we attempt to extend this observation to other models and to another protein, to show the limits of its applicability to other species, and to define its cellular and physiopathological significance.

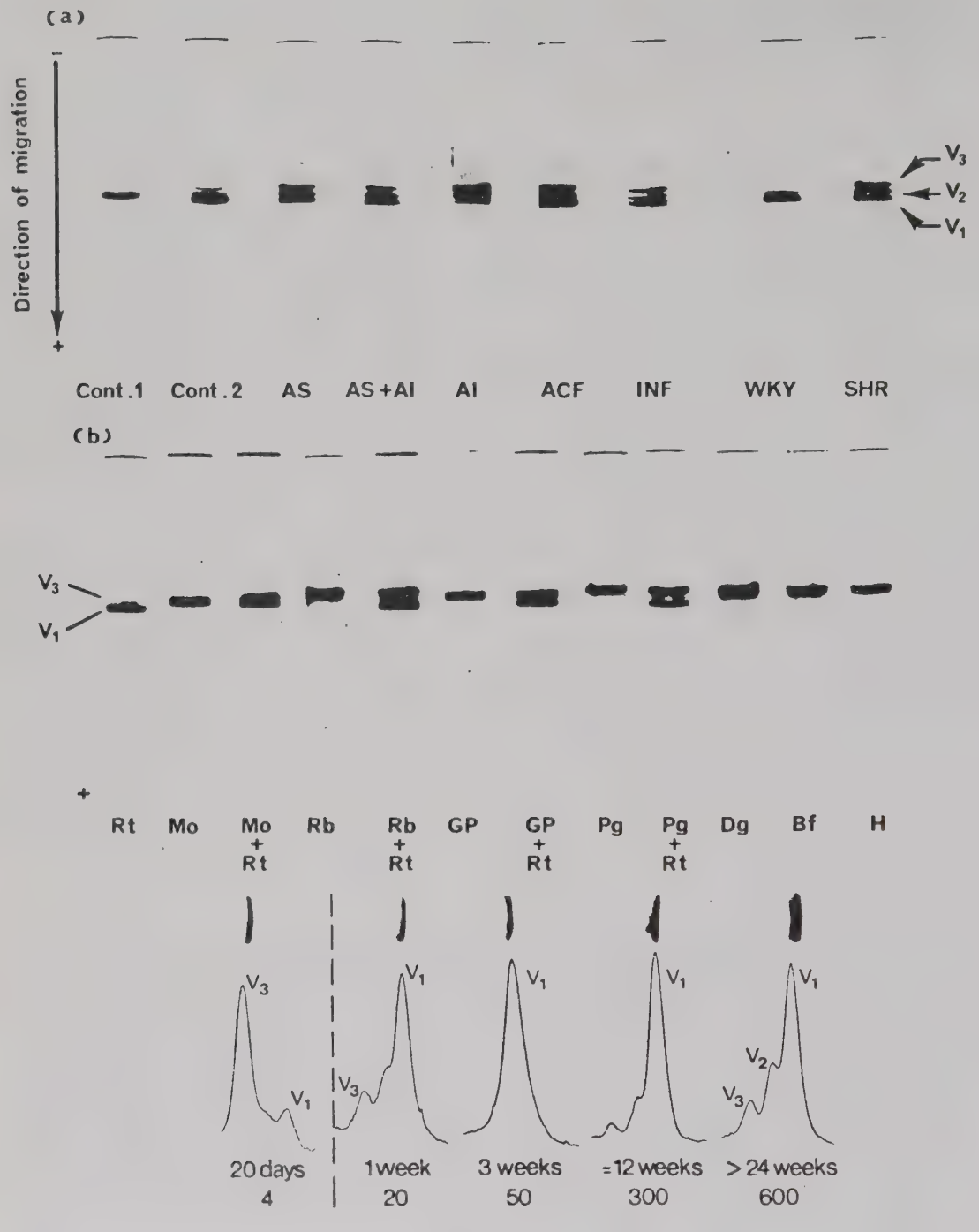
#### METHODS

Aortic stenosis and insufficiency (AS and AI), experimental infarction and aorto-caval fistulae were created using techniques described elsewhere[8]. The combination of AS + AI was established in two phases at 15-day intervals. A series of spontaneously hypertensive Okamoto rats, 42 weeks of age, was compared with a group of Wistar Kyoto rats. Male Wistar rats were used for the remaining studies. Animals weighing 200 g were used. Tissue extraction, pyrophosphate gel electrophoresis, peptide mapping and immunochemical analyses were carried out following procedures described elsewhere[7, 8]. The myosin light chain kinase activity was measured using radioactive ATP after passage of the cytoplasmic extract over a DEAE Sephacel column. The maximal contractile rate was measured using the zero-load clamp technique of Brutsaert[9].

#### RESULTS

The isoenzymic profile of normal ventricular rat myosin is highly reproducible, showing a clear preponderance of the rapidly migrating form V1 (Fig. 1). While with age there is a slight increase in the slowly migrating form, V3, it always remains the less prevalent of the two. Redistribution favoring V3 at the expense of V1 is seen for all models studied: AS, AI, AS + AI, infarction, aorto-caval fistula and spontaneous hypertension, provided that the overload is of sufficiently long duration. The changes involve both the endocardium and the epicardium, and, as shown by the fact that they are also seen in myocytes isolated using the collagenase techniques[10], are not due to contamination by non-muscular cells.

*Figure 1* *Ventricular isoenzymes of cardiac myosin.* Polyacrylamide-gel electrophoresis in the presence of pyrophosphate. (a) Normal Wistar adult rat, young (cont. 1) or aged (cont. 2) Wistar Kysto (WKY). Rat having aortic stenosis and/or insufficiency for 40 days (AS, AS + AI, AI), aorto-caval fistulae (ACF) or myocardial infarction by ligature (INF). Rat with genetic hypertension (SHR). Note the predominance of the isoenzyme form V1 in the normal rat. In mechanical overload, either the three isoenzymes (V1, V2 and V3) are present in equal proportions, or V3 is predominant (reproduced by permission of the American Heart Association Inc., from Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. Circ Res 1981; 49: 525–32). (b) Normal rat (Rt), mouse (Mo), rabbit (Rb), guinea pig (GP), pig (Pg), dog (Dg) and cow (Bf) left ventricles. H = normal human heart taken at autopsy. Mo + Rt indicates that samples from two animal species were electrophorezed together. Note the fact that the pig, the cow and man have only the V3 form of the enzyme, while in the rat and the mouse, form V1 predominates (high ATPase, correlated with high Vmax). (c) The rat at various stages in development. The vertical broken line indicates birth, note the sudden change from the V3 to the V1 form at this time. The fetal V3 form reappears with aging or after mechanical overload [see (a)]. (b) and (c) Reproduced by permission of Academic Press, from Lompré AM, Mercadier JJ, Wisnewsky C, Bouveret P, Pantaloni C, d'Albis A, Schwartz K. Species and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. Dev Biol 1981; 84: 286–90.


(a)
Direction of migration
-
+
V3
V2
V1
Cont.1
Cont.2
AS
AS+AI
AI
ACF
INF
WKY
SHR
(b)
V3
V1
+
Rt
Mo
Mo + Rt
Rb
Rb + Rt
GP
GP + Rt
Pg
Pg + Rt
Dg
Bf
H
V3
V1
V1
V3
V1
V1
V2
V3
V1
20 days
4
1 week
20
3 weeks
50
=12 weeks
300
> 24 weeks
600

While in young animals the isoenzymic profile is the same for both ventricles, with age there is a progressive and parallel increase in the V3 form, and the left ventricle peripheral resistance. In the aged animal, there is thus a clear asymmetry between the two ventricles. This asymmetry is also seen in left ventricle overload with a reduction as the terminal stage is reached.

Isoenzymic changes can be observed after one month in pressure overload due to aortic stenosis, with onset occurring around the 40th week in rats with hereditary hypertension; in all cases, there was a linear correlation with the degree of hypertrophy[8]. This situation is different for pure volume overloads, for example as seen with aortocaval fistulae, in which the isoenzymic change and the decrease in contractile rate[11] is delayed, occurring after several months (at which point hypertrophy is already highly developed). Thus, there is no linear correlation between the degree of hypertrophy and the isoenzymic change. The situation for aortic insufficiency, a volume overload with development of a pressure component, is analogous to that for simple pressure overload.

The drop in myosin ATPase is purely a function of the isoenzymic change, and it thus shows a linear correlation with the decrease in maximal contractile rate. This latter parameter was measured by the zero-load clamp technique, papillary muscles being taken immediately afterwards for extraction of myosin and quantification of isoenzymic distribution. Correlations were established by biochemical analysis of muscles with highly variable contractile rates, taken from both young and aged rats which were normal, hypophysectomized or had long-standing pressure overload. A linear correlation could be shown between the maximal contractile rate, expressed as distance per second, and percentage of slowly migrating myosin V3 ($r = 0{\cdot}90$ $P < 0{\cdot}001$).

The enzymatic activity of myosin light chain kinase was measured in cytoplasmic extracts of normal or hypertrophied heart after passage over DEAE Sephacel. This enzymatic extract was semi-purified to compensate for the high phosphatase level of cardiac homogenates. Elution was with KCl. The enzyme phosphorylates one of the myosin light chain, L2, as substrate, and is dependent upon calmodulin.

It is eluted along with other non-calmodulin-dependent cardiac kinases. In myocardial hypertrophy there is an increase in the activity of this enzyme. There is thus a change in the activity of an enzyme which, at least in smooth muscle, regulates the activity of sarcomeric proteins.

**Protein and ribonucleic acid synthesis**

The exact molecular signal linking the rise in pressure to the stimulation of RNA synthesis (and thus, to protein synthesis) is not known. In cases of pressure overload, this stimulation occurs very early[12] and is almost as fast as the accompanying changes in coronary flow rate or substrate consumption (reviewed in Morkin *et al.*[13]).

The *in vivo* study of these phenomena is complicated by several factors: surgical shock has significant effects, and rigorous controls are necessary; radioactive precursors may be recycled after incorporation, yielding misleading results; finally, the true precursor is frequently unknown, or when known, its measurement is difficult or impossible.

The continous infusion[14] of a radioactive precursor into a conscious animal has constituted a significant step forward, since, at least for proteins, it allows attainment of a steady-state, the specific radioactivity of the precursor remaining unchanged. This technique was applied to the study of total protein synthesis in aortic stenosis and aortic insufficiency, to the study of the two myofibrillar proteins, and to the comparative evaluation of protein and RNA synthesis after pressure overload.

TECHNIQUES

Synthesis of protein or nucleic acids was studied 2, 4 and 8 days after experimental aortic insufficiency or stenosis. A heparinized catheter was placed in the jugular vein one day preceding infusion. On the day of infusion, the non-anesthetized rats were immobilized in a special cage, and the radioactive precursor (amino acids or uridine) was infused at a rate of 0·5 ml/h in physiological saline + heparin. At the end of infusion, a plasma sample was taken for determination of the specific radioactivity of the circulating precursor. The intracellular precursor and the product, protein or RNA, was extracted from the ventricles. Three experimental groups were studied.

*Group 1*

The precursor was [$^3$H] lysine 10 $\mu$Ci/ml. Both ventricles were homogenized and precipitated with 10% TCA after extraction in boiling water. The TCA-supernatant yielded the precursor, free lysine, while the TCA pellet contained the product, lysine incorporated into total protein. Bound lysine was obtained by hydrolysis produced by immersing the tissue for

22 h at 120 °C in 6N HCl. Specific radioactivity (in c.p.m./mol lysine) was determined after isolation of lysine by high-voltage electrophoresis[15]. The total protein synthesis rate was determined on the basis of the Garlick equation[14], based on the ratio of specific radioactivity of protein-bound lysine to specific radioactivity of free intracellular lysine. It is expressed in terms of per cent protein synthesized in one day. These determinations were carried out both in controls and two to 60 days after creation of aortic stenosis or insufficiency.

*Group 2*

The precursor was [$C^{14}$] tyrosine 50 μCi/ml. At the end of infusion, a sample of ventricular tissue was subjected to the TCA-treatment described above to measure the specific radioactivity of free intracellular tyrosine. The remaining tissue was homogenized and myofibrils were prepared using Etlinger's protocol[16]. The myofibrils were then placed on a polyacrylamide gel electrophoresis SLAB in the presence of SDS for separation of myosin-heavy chain and actin. Proteins were hydrolysed on the gel itself using 6N HCl, and protein-bound tyrosine was separated by tyrosine treatment[14]. Calculations were as described above. This procedure was carried out in controls, and then again one to eight days after aortic stenosis.

*Group 3*

Two precursors were administered, [$C^{14}$] tyrosine 10 μCi/ml, added at the beginning of the experiment, and [$H^3$] uridine 170 μCi/ml, added after 3 h infusion. After administration of the precursor, the heart was frozen in liquid nitrogen, and one-half the cardiac tissue was treated with 10% TCA to separate free from protein-bound tyrosine; the second half of the heart was used for isolation of the various acid-soluble free uridine phosphates. These were converted to UMP by phosphodiesterase treatment, and UMP was isolated and purified by column chromotography, first on Dowex 1 X 8, and then by HPLC on Partisil 10 SA X[17]. RNA purified by phenol treatment was analysed by electrophoresis and ribosomal fraction 28 S was isolated by electroelution. After hydrolysis, UMP was isolated using this same technique and its specific radioactivity (in c.p.m./mol) was measured. This procedure was carried out one to eight days after creation of the stenosis.

RESULTS

*Group 1*

The protein synthesis rate for the normal heart is 12·8 ± 1·6% per day. In the steady state, this synthesis rate is counterbalanced by the rate of lysis, and it thus represents turnover. In the two models studied, stenosis and aortic insufficiency, the degree of hypertrophy was comparable after one or two months (ventricles: 1·56 ± 0·15 g after stenosis, 1·49 ± 0·05 g after aortic insufficiency; 1·14 ± 0·04 g in paired controls); nevertheless, the two models differ in the rate at which hypertrophy occurs; after stenosis, a plateau was attained within one week, while this plateau was reached three to four weeks after experimental aortic insufficiency.

In both types of overload, the rate of synthesis (here, no longer equal to the turnover rate) doubles, increasing to 24·8% per day after six days of stenosis and to 28% per day, three weeks after aortic insufficiency. The principle difference between these two types of overload is that, for volume overload, the peak in protein synthesis (attained approximately four days after stenosis) takes much longer to be reached

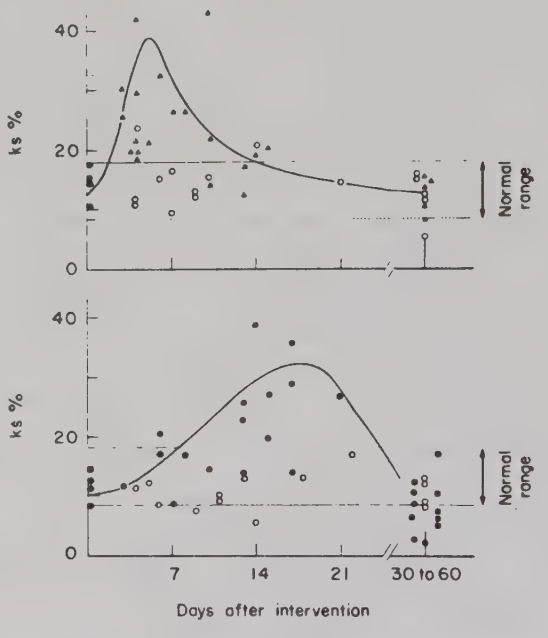



*Figure 2* Total myocardial protein synthesis, measured with the continuous infusion technique in normal (○), sham-operated (no mechanical overload, ○), after stenosis (AS, ▲), aortic insufficiency (AI, ●), stenosis + aortic insufficiency (AS + AI, ■). ks = Turnover rate (in controls) or synthesis rate (after mechanical overload) of total ventricular proteins, expressed as percentage protein synthesized or turned over in 24 h (reproduced by permission of Academic Press, from Moalic JM, Bercovici J, Swynghedauw B. Protein synthesis is systolic and diastolic overload in rats. A comparative study. Cardiovasc Res 1981; 15: 515–21).

and is eventually attained after about 15 days (Fig. 2).

In all cases, synthesis rates were normal during the period of compensated hypertrophy and in chronic cardiac failure.

*Group 2*

In the normal state, the synthesis rate for myosin heavy chain (the thick filament protein) is twice as rapid as that of actin (the thin filament protein), 22 and 11% respectively. Both rates double after four days of aortic stenosis (39 and 21%), with the proportional relationship being maintained (1·9 to 2·0).

*Group 3*

The rates of synthesis of protein and ribosomal RNA (fraction 28 S) were simultaneously measured for a given heart one and four days after aortic stenosis. As seen above, protein synthesis was stimulated in this model by days 3–4, increasing from 26 to 41%. RNA synthesis was calculated using a different model[17], taking into account the fact that the specific radioactivity of the precursor, UMP, increases linearly over time for 22 h with no plateau being attained. The rate of ribosomal RNA synthesis, 24% per day, was little modified after two or three days of stenosis, i.e. at the peak of protein synthesis it showed little increase. This can be taken to mean that the increase in protein synthesis can be achieved by the pre-existing ribosomal stock.

## Discussion

Considering the heart as a muscle, there are two mechanisms for adaptation to prolonged mechanical overload: hypertrophy and slowing of the maximal contractile rate; this paper studies the biochemical correlates of these changes.

There is a linear correlation between maximal contractile rate and myosin ATPase; the former represents the maximal working capacity of a muscle. Slowing of the maximal contractile rate of the cardiac fiber (papillary muscle) in chronic mechanical pressure overload is now well-established, at least when appropriate techniques are used for measurement. This is also the case for *in situ* measurements of the whole heart; the controversy concerning this point appears increasingly artificial and is largely based upon technical errors. The decrease in myosin and myofibrillar ATPase under these same conditions is well-established and, as we have shown[7], reflects the isoenzymic change in myosin in favor of the low ATPase form. This change is seen in all types of chronic overload in the rat studied to date[18], although it is less marked in pure volume overload, e.g. aorto-caval fistula. It is attributable to the recurrence of the fetal form of myosin[18]. A similar change is observed in other animal species which have a variety of myosin isoenzymes (e.g. the rabbit—unpublished results). On the other hand, the problem remains unresolved for species such as man in which normally only a single myosin isoenzyme is seen in electrophoresis.

In man, while chronic mechanical overload does not modify the single myosin isoenzyme, it does modify myofibrillar ATPase; it may also change peptide mapping and the immunochemical properties of the protein, and therefore it can be hypothesized that there are various co-migrating enzymes. Another hypothesis is that a second sarcomeric 'isoprotein' system is involved, e.g. troponin.

Immediately after pressure overload, simple cardiac mechanical factors lead to a slowing of the instantaneous contractile rate[1]. For a given muscle there is an optimal yield (g work/energy consumed) at a given contractile rate. Any increase in afterload automatically results in a decrease in the rate of contraction, and thus, a decrease in yield. The modification of myosin isoenzymatic expression helps to palliate this deficit with a shift in the energy utilization curve to produce an optimal yield at a slower contractile rate. This shift allows the heart to work more slowly, on a different rate-pressure curve and with a normal or improved energy-conversion yield. This interpretation has been confirmed by measurement of papillary intramuscular temperature which shows that the hypertrophied muscle produces less heat[1] for a given increase in tension.

Like other authors[8,15] we have seen that these changes occur later in volume overload, where they are perhaps also attributable to the progressive development of a pressure component; in some volume-overload models, they may never occur[11]. This is in keeping with the interpretation offered above, since from the strictly mechanical viewpoint, by changing the preload, volume overload accelerates the instantaneous contractile rate.

Physiologically, isoenzymatic change is a common modality of environmental adaptation; an example is the change in lactic acid dehydrogenase during altitude adaptation. Under mechanical overload conditions other cardiac enzymes are undoubtly involved, including lactic dehydrogenase[20], and probably both creatine kinase (unpublished results) and sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, as suggested by Schwartz *et al.*[21].

*Table 1 Factors in myocardial adaptation to mechanical overload*

| Processes involved | Starling's law (tension–length curve) | Laplace law (T = Pr/2h)* | Rate/tension curve |
|---|---|---|---|
| Immediate consequences of overload | Increase in passive tension | Increase in resistance of T | Slows instantaneous contractile rate |
| Triggering factor | Stretch | Wall stress | Energy yield |
| Biological adaptational factors | Multiplication of sarcomeres | Protein synthesis | Isoenzymic change in myosin |
| Physiological consequences | Hypertrophy | Hypertrophy | Slowing of contractile rate |
| Types of overload | Pressure or volume | Pressure or volume | Pressure |

*T = wall stress; P = pressure; r = radius; h = thickness.

There are similar changes in at least two of the principal cardiac proteins. Since the rise in ribosomal RNA occurs relatively late compared to protein synthesis, the increase in protein synthesis may be attributable to synthesis or activation of messenger RNA.

Two factors appear to be involved in signaling this change: passive stretch and parietal tension[22]. Indeed the simple stretching of a papillary muscle or a cultured cell[23] stimulates protein synthesis. Furthermore, electrical stimulation has the same effect, provided that the muscle is maintained under tension. The adaptive role of sarcomere multiplication, with correction of the passive stretch caused by mechanical overload by the action of Starling's law and the increase in end-diastolic volume, is obvious. The increase in tissue mass allows progressive normalization of wall stress, initially increased by overload due to three factors: tension, radius and thinning of the ventricular wall (Table 1). By decreasing wall stress, hypertrophy compensates for the lower maximal contractile rate.

Physiologically, pressure overload, compensated for both by hypertrophy and by a slowing of the maximal contractile rate can be contrasted with volume overload which, at least when unaccompanied by secondary pressure overload, is compensated for by hypertrophy alone. This would explain why the isoenzymic myosin change is so poorly correlated with the degree of hypertrophy in aorto-caval fistulae, which is an example of pure volume overload.

## References

[1] Alpert NR, Mulieri LA. The utilization of energy by the myocardium hypertrophied secondary to pressure overload. In: Strauer BE, ed. The heart in hypertension. Berlin: Springer Verlag, 1981: 153–63.

[2] Swynghedauw B, Leger JJ, Schwartz K. The myosin isozyme hypothesis in chronic heart overloading. J Mol Cell Cardiol 1976; 8: 915–24.

[3] Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J Gen Physiol 1967; 50: 197–216.

[4] Delcayre C, Swynghedauw B. A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. Pflügers Arch 1975; 355: 39–47.

[5] Hoh JFY, McGrath PA, Hale PT. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. J Mol Cell Cardiol 1977; 10: 1053–76.

[6] Sartore S, Pierobon-Biormioli S, Schiaffino S. Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart. Nature 1978; 274: 82–3.

[7] Lompré AM, Schwartz K, D'Albis A, Lacombe G, Thiem NV, Swynghedauw, B. Myosin isozymes redistribution in chronic heart overloading. Nature 1979; 282: 105–7.

[8] Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. Circ Res 1981; 49: 525–32.

[9] Brutsaert DL, de Clerck NM, Goethals MA, Housmans PR. Relaxation of ventricular cardiac muscle. J Physiol 1978; 283: 469–80.

[10] Cutilletta AF, Aumont MC, Nag AC, Zak R. Separation of muscle and non-muscle cells from adult rat myocardium and application to the study of RNA polymerase. J Mol Cell Cardiol 1977; 9: 399–407.

[11] Cooper G IV, Puga FJ, Zujko KL, Harrison CE, Coleman HN III. Normal myocardial function and

energetics in volume-overload hypertrophy in the cat. Circ Res 1973; 32: 140–8.
[12] Everett AW, Sparrow MP, Taylor RR. Early changes in myocardial proteins synthesis *in vivo* in response to right ventricular pressure overload in the dog. J Mol Cell Cardiol 1979; 11: 1253–63.
[13] Morkin E, Kimata S, Skillman JJ. Myosin synthesis and degradation during development of cardiac hypertrophy in the rabbit. Circ Res 1972; 30: 690–702.
[14] Garlick PJ, Millward DJ, James WPT, Waterlow JC. The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. Biochim Biophys Acta 1975; 415: 71–84.
[15] Moalic JM, Bercovici J, Swynghedauw B. Protein synthesis in systolic and diastolic overloading in rat. A comparative study. Cardiovasc Res 1981; 15: 515–27.
[16] Etlinger JD, Zak R, Fischman DA, Rabinowitz M. Isolation of newly synthetized myosin filaments from skeletal muscle homogenates and myofibrils. Nature 1975; 255: 259–61.
[17] Ray A. Métabolisme des acides ribonucleiques ribosomiques du coeur de mammifère. Thèse de Sciences. Université de Grenoble (France), 1981.
[18] Lompré AM, Mercadier JJ, Wisnewsky C, Bouveret P, Pantaloni C, D'Albis A, Schwartz K. Species- and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. Dev Biol 1981; 84: 286–90.
[19] Sonnenblick EH. Force velocity relations in mammalian heart muscle. Am J Physiol 1962; 205: 931–9.
[20] Bishop SP, Altschuld RA. Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. Am J Physiol 1970; 218: 153–9.
[21] Schwartz A, *et al.* Abnormal biochemistry in myocardial failure. Am J Cardiol 1973; 32: 407–22.
[22] Peterson MB, Lesch M. Protein synthesis and amino acid transport in the isolated rabbit right ventricular papillary muscle. Effect of isometric tension development. Circ Res 1972; 31: 317–27.
[23] Vandenburgh H, Kaufman S. *In vitro* model for stretch induced hypertrophy of skeletal muscle. Science 1979; 203: 265–8.

## RESUME

Les propriétés mécaniques des phases de contraction et de relaxation ont été étudiées sur des cœurs de rats normaux et après surcharges hémodynamiques chroniques. Certaines modifications mécaniques observées au cours de l'hypertrophie cardiaque sont correlées avec des modifications biochimiques des protéines contractiles ; cela représente un mode d'adaptation du tissu myocardique à une situation hémodynamique pathologique engendrée par la surcharge chronique. Le laser, grâce à une technique de diffraction, permet de mesurer les mouvements coordonnés des protéines contractiles composant le sarcomère, unité mécanique et histologique du tissu musculaire strié, squelettique et cardiaque.



Mots-clé : - Contractilité, sarcomère,
- Laser,
- Hypertrophie cardiaque.